

Aus dem Institut für Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Zelluläre Lokalisation des Meningeom-assoziierten
Antigens TXNDC16 und Charakterisierung
immunogener Proteinbereiche

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Christian Clemens Harz
geb. am: 08.07.1981 in Saarbrücken

*So come up to the lab und see what's on the slab.
I see you shiver with antici... pation...*

(Dr. Frank N. Furter)

The Rocky Horror Picture Show

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis.....	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
1 Zusammenfassung	x
Summary.....	xi
2 Einleitung.....	1
2.1 Meningeome	1
2.2 TXNDC16 - ein Meningeom-assoziiertes Antigen	1
2.3 Das Immunsystem	4
2.4 Krebs und Tumor-assoziierte Antigene.....	5
2.5 Zielsetzung	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Material	9
3.1.1 Chemikalien und Medien	9
3.1.2 Enzyme und Reaktionskits	10
3.1.3 Größenstandards für Agarose- und SDS-Polyacrylamidgele	11
3.1.4 DNA-Oligonukleotide	12
3.1.5 Vektoren	14
3.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper.....	16
3.1.7 Patientenmaterial	17
3.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterial	19
3.1.9 Software, Online-Tools und Datenbanken	20
3.2 Mikrobiologische Methoden	23
3.2.1 Kultur und Lagerung von Bakterien.....	23
3.2.2 Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> DH5 α	24
3.2.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i> DH5 α	25
3.2.4 Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen	25
3.3 Zellbiologische Methoden.....	27
3.3.1 Kultur und Lagerung eukaryotischer Zellen.....	27

3.3.2	Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer.....	28
3.3.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	29
3.3.4	Ernte der Zellkulturüberstände	31
3.3.5	Immunfluoreszenz-Färbung	32
3.3.6	Durchflusszytometrie	33
3.4	Molekularbiologische Methoden	35
3.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> - PCR).....	35
3.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.4.3	Aufreinigung doppelsträngiger DNA.....	37
3.4.4	Photometrische Messung der DNA-Konzentration.....	37
3.4.5	Verdau von doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen	38
3.4.6	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	38
3.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	39
3.4.8	Phosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA.....	40
3.4.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	40
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.5.1	Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen.....	42
3.5.2	Proteinfällung aus Zellkulturüberständen	42
3.5.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	43
3.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.5.5	Western Blot.....	46
3.5.6	Methoden der <i>in vitro</i> Proteinsynthese und -translokation	48
3.5.7	Markierungsversuche mit Maleimid-Polyethylenglykol.....	50
3.6	Serologische Methoden	52
3.6.1	TXNDC16-Peptidarray	52
3.6.2	Bioinformatische Auswertung der Peptidarrays	53
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Zytosolische Assoziation von TXNDC16 mit dem Endoplasmatischen Retikulum.....	56
4.1.1	Immunfluoreszenz von TXNDC16-HA in HeLa-Zellen	56
4.1.2	Keine Proteinase K-Resistenz von TXNDC16-HA	57
4.1.3	Molekularer Shift von myc-TXNDC16-DKEL	59
4.1.4	Bestimmung der zytosolischen Lokalisation mittels FACS.....	61
4.1.5	Funktionalität und Abspaltung des Signalpeptids von TXNDC16	63
4.1.6	Sezernierung von TXNDC16 in das Zellkulturmedium.....	66

4.1.7	Keine Funktionalität des maskierten ER-Retentionssignals von TXNDC16	67
4.1.8	Keine exosomale Lokalisation von TXNDC16 im Zellkulturüberstand	71
4.2	Peptidarray zur Bestimmung immunogener Epitope von TXNDC16	73
4.2.1	Datenprozessierung	73
4.2.2	Klassifikation von Meningeomseren anhand spezifischer Epitopmuster....	79
5	Diskussion.....	83
5.1	Co-translationale Translokation von TXNDC16 ins ER	85
5.2	Retrograde Translokation von TXNDC16 ins Zytosol?	88
5.3	Sekretorisches Verhalten von TXNDC16	92
5.4	Funktionalität von TXNDC16.....	98
5.5	Immunogene Epitope von TXNDC16.....	104
5.6	Ausblick	108
6	Literatur	110
7	Anhang.....	123
8	Publikationen	136
9	Danksagung	137

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	DNA-Größenstandards.....	11
Abbildung 2:	Protein-Größenstandard.....	12
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Oberfläche einer Neubauer-Zählkammer	29
Abbildung 4:	Zelluläre Lokalisation von TXNDC16-HA in HeLa-Zellen mittels Konfokalmikroskopie (SIM) unter der Verwendung eines HA-spezifischen monoklonalen Antikörpers	57
Abbildung 5:	<i>Phosphorimaging</i> des Sequestrierungsversuchs von TXNDC16 in Mikrovesikel.....	58
Abbildung 6:	Molekularer Shift von TXNDC16 nach Inkubation mit Maleimid-Polyethylenglykol (malPEG).....	60
Abbildung 7:	FACS-Analyse zur zellulären Lokalisation von TXNDC16 in HeLa-Zellen.....	62
Abbildung 8:	Lokalisation der Deletionsvariante Δ SP-TXNDC16-HA, von GFP und der GFP-Variante SP-TXNDC16-GFP in HeLa-Zellen	64
Abbildung 9:	Co-translationale Translokation von GFP und SP-TXNDC16-GFP in Raue Mikrosomen (RM) bzw. semipermeabilisierte Zellen (<i>semi permeable cells</i> - SPC) mittels gekoppelter <i>in vitro</i> Transkription und Translation	66
Abbildung 10:	Sezernierungsverhalten von TXNDC16 in humanen Zelllinien	67
Abbildung 11:	Sezernierung von myc-TXNDC16 in Abhängigkeit des Carboxyterminus	68
Abbildung 12:	Sezernierung von GFP in Abhängigkeit des Amino- & Carboxyterminus	69
Abbildung 13:	Keine exosomale Lokalisation von TXNDC16 und SP-TXNDC16-GFP im Überstand von HEK293-Zellen	72
Abbildung 14:	Klassifizierung der Peptide nach Seropositivität und Seronegativität	74
Abbildung 15:	Heatmap der Peptidintensitätswerte nach Threshold-basierender Klassifizierung	75

Abbildung 16: Hierarchisches Dendogramm der Peptidarrays zur Epitopbestimmung von TXNDC16 nach Klassifizierung der Peptidintensitätswerte	76
Abbildung 17: Korrelation der H1428-Peptidarrays.....	78
Abbildung 18: <i>Feature Selection</i> zur Trennung der Meningeom- von Normalseren anhand seroreaktiver Epitope	80
Abbildung 20: Graphische Darstellung mittels „SignalP“ generierter Vorhersagewahrscheinlichkeiten putativer Signalpeptide für TXNDC16- und GFP-Varianten	86
Abbildung 21: Thioredoxin-(TRX)-Domäne von TXNDC16 mit den Sequenzmotiven CX ₆ C und SXXC	100
Abbildung 22: Nukleotid- und Aminosäurevergleich der TXNDC16-Carboxytermini in ausgewählten eukaryotischen Organismen	101
Abbildung 23: Vergleich der Carboxytermini des Selenoproteins TrxR und TXNDC16 bei Primaten	103
Abbildung 24: Zirkuläre Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pCMV-SPORT6.....	127
Abbildung 25: Zirkuläre Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pSG5	127
Abbildung 26: Zirkuläre Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pEGFP-N1	128
Abbildung 27: Klonierungsstrategie für pSG5-TXNDC16-HA	128
Abbildung 28: Klonierungsstrategie für pSG5-ΔSP-TXNDC16-HA	129
Abbildung 29: Klonierungsstrategie für pSG5-TXNDC16.....	129
Abbildung 30: Klonierungsstrategie für pSG5-myc-TXNDC16.....	130
Abbildung 31: Klonierungsstrategie für pSG5-ΔSP-myc-TXNDC16.....	130
Abbildung 32: Klonierungsstrategie für pSG5-myc-TXNDC16-DKEL	131
Abbildung 33: Klonierungsstrategie für pSG5-GFP.....	131
Abbildung 34: Klonierungsstrategie für pSG5-SP-TX-GFP	132
Abbildung 35: Klonierungsstrategie für pSG5-SP-TX-GFP-TX3'	132
Abbildung 36: Klonierungsstrategie für pSG5-SP-TX-GFP-DKEL	133

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PCR-Primer zur Herstellung der verschiedenen cDNA-Konstrukte von TXNDC16 und GFP	12
Tabelle 2:	Herstellungsparameter der verwendeten Plasmide.....	15
Tabelle 3:	Colony-PCR-Primerpaare zur Validierung der pSG5-Klonierungen	16
Tabelle 4:	Primär- und Sekundärantikörper	16
Tabelle 5:	Patientendaten der Meningeompatienten (H-Nummer) und der gesunden Kontrollprobanden (N-Nummer).....	17
Tabelle 6:	Verwendete humane Zelllinien und die Bedingungen der Subkultivierung.....	27
Tabelle 7:	Transfektionsbedingungen der verwendeten eukaryotischen Zelllinien ..	30
Tabelle 8:	Transfektionsbedingungen der Calciumphosphat-Transfektion für HEK293-Zellen.....	30
Tabelle 9:	Pipettierschema der BSA-Eichgerade zur Verwendung im Bradford-Assay	43
Tabelle 10:	Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen.....	45
Tabelle 11:	Klassifizierung der TXNDC16-Peptide nach Verteilung der Intensitäten ..	74
Tabelle 12:	Ergebnisse der Trennung der Meningeomseren von Normalseren mit allen Peptiden und nach <i>Feature Selection</i>	79
Tabelle 13:	Peptidsequenz und Position der fünf informellen Epitope im TXNDC16-Protein	81
Tabelle 14:	Sequenzhomologien der informellen Epitope von TXNDC16 zu Proteinen aus Bakterien und Pilzen	81
Tabelle 15:	Aminosäuresequenzen der 15mer-Peptide von TXNDC16 (Peptidarray)	123
Tabelle 16:	Übersicht über die Zusammenstellung der Peptidarray-Durchgänge	125

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
aa	Aminosäure(n)
APC	<i>antigen presenting cells</i> - antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	<i>bovine serum albumine</i> - Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
C-	Carboxy-
cDNA	<i>complementary</i> DNA
Ci	Curie
CIDB	„Cancer Immunome Database“
CT	Computertomographie
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	Dithiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECL	<i>enhanced chemilumnesence</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ERFAD	<i>ER flavoprotein associated with degradation</i>
et al.	<i>et alii</i> - und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> - fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> - grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	zweifach deionisiertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> - Meerrettich-Peroxidase

IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
Igk	Immunglobulin leichte Kette kappa (κ)
kb	Kilobasen
LB	<i>lysogeny broth</i>
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
m	Meter
M	Molarität [mol/l]
mA	Milliampère
malPEG	Maleimid-Polyethylenglykol-5kDa
MCS	<i>multiple cloning site</i> - multiple Klonierungsstelle
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> - Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute(n)
mol	Stoffmenge
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Nano (10^{-9})
N-	Amino-
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i> - nonsense-vermittelter mRNA-Abbau
o. a.	oben angegeben
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PA	Peptidarray
PAGE	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pca	<i>prostate carcinoma</i> - Prostatakrebs
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSS	<i>phosphate saline saponine</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RM	Raue Mikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> - reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rotations per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeC	Selenocystein
SEREX	<i>serological identification of antigens by recombinant expression cloning</i>
SIM	<i>simultaneous laser light stimulation and imaging</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i> - Einzelnukleotidpolymorphismen
SOB	<i>super optimal broth</i>

SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SP	Signalpeptid
SPC	<i>semi permeable cells</i> - semipermeabilisierte Zellen
SRP	<i>signal recognition particle</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	<i>Tris acetate EDTA</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> - Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfB	<i>transformation buffer</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TRX	Thioredoxin
TXNDC16	<i>thioredoxin domain containing 16</i>
U	<i>unit</i> - Enzymeinheit
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i> - untranslatierte Region
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> - Volumenprozent
w/v	<i>weight per volume</i> - Gewichtsprozent
WB	Western Blot
WHO	<i>world health organization</i>
z. B.	zum Beispiel
z. Z.	zur Zeit

Nukleinasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabencode

A (Ala)	Alanin	I (Ile)	Isoleucin	R (Arg)	Arginin
C (Cys)	Cystein	K (Lys)	Lysin	S (Ser)	Serin
D (Asp)	Asparaginsäure	L (Leu)	Leucin	T (Thr)	Threonin
E (Glu)	Glutaminsäure	M (Met)	Methionin	V (Val)	Valin
F (Phe)	Phenylalanin	N (Asn)	Asparagin	W (Trp)	Tryptophan
G (Gly)	Glycin	P (Pro)	Prolin	Y (Tyr)	Tyrosin
H (His)	Histidin	Q (Gln)	Glutamin	X	beliebig

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisation des Meningeom-assoziierten Antigens *thioredoxin domain containing 16* (TXNDC16) näher untersucht werden.

- Die bereits bekannte Assoziation von TXNDC16 mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) konnte mittels konfokalmikroskopischen Aufnahmen humaner Zelllinien bestätigt werden.
- Das aminoterminal Signalpeptid von TXNDC16 ist essenziell für dessen co-translationale Translokation ins ER. Eine Fusionierung von GFP mit dem aminoterminalen TXNDC16-Signalpeptid ändert dessen ubiquitäre Lokalisation in eine ER-Lokalisation.
- Trotz co-translationaler ER-Translokation konnte für TXNDC16 mittels differenzieller Permeabilisierung von HeLa-Zellen anhand von Western Blot und Durchflusszytometrie-Analysen eine zytosolische Lokalisation ermittelt werden.
- TXNDC16 durchläuft bei humanen Zelllinien den sekretorischen Weg und konnte extrazellulär detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Carboxyterminus von TXNDC16 sowohl bei TXNDC16 als auch bei GFP keine Retentionsfunktion besitzt.
- Für TXNDC16 existiert vermutlich sowohl eine zytosolische ER-assoziierte als auch eine sezernierte Form. Sequenzanalysen deuten auf eine Beteiligung von TXNDC16 am Redox-System sowie mögliche proteinbindende Eigenschaften hin.

Weiterhin sollten, auf Grund der Immunogenität von TXNDC16 in Meningeomseren, mithilfe eines aus 163 TXNDC16-repräsentierenden Peptiden bestehenden Arrays, immunogene Epitope von TXNDC16-Autoantikörpern im Serum von 24 Meningeompatienten identifiziert werden.

- Es konnte zum ersten Mal eine Klassifizierung von Meningeompatienten und gesunden Kontrollen anhand eines Sets aus fünf immunogenen Epitopen der TXNDC16-Peptide mit einer Genauigkeit von über 87 % erreicht werden.

Summary

Subcellular localization of the meningioma-associated antigen TXNDC16 and characterization of immunogenic protein regions

The aim of the study was to analyze the subcellular localization of the meningioma-associated antigen thioredoxin domain containing 16 (TXNDC16).

- The previously reported association of TXNDC16 with the endoplasmic reticulum (ER) was confirmed by confocal microscopy of human cell lines.
- The amino terminal signal peptide of TXNDC16 is essential for its co-translational translocation into the ER. Fusing the green fluorescent protein (GFP) with the TXNDC16 signal peptide causes a change of the ubiquitous localization into an ER localization.
- Despite co-translational ER translocation, a cytosolic localization of TXNDC16 was shown by Western blot and flow cytometry using differential permeabilized HeLa cells.
- In human cell lines, TXNDC16 is a protein secreted into extracellular space probably by a Golgi-independent pathway. The carboxy terminus of TXNDC16 does not have any ER retention effect, neither for TXNDC16 nor for GFP.
- It is hypothesized that there are likely two forms of TXNDC16 including a cytosolic ER-associated and a secreted form. Sequence analyses indicate potential redox activity and protein binding properties.

Immunogenic epitopes of TXNDC16 were identified with sera of 24 meningioma patients using peptide arrays with 163 TXNDC16 spanning peptides.

- Meningioma patients and healthy controls were differentiated by using peptide arrays, achieving an accuracy of 87 % with only five immunogenic TXNDC16 epitopes.

2 Einleitung

2.1 Meningeome

Meningeome sind Tumore, die sich aus den Zellen der Spinnwebhaut (*Arachnoidea mater*) entwickeln. Sie zählen mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 7 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren und machen ca. 35 % aller primären Hirntumore aus [1,2]. Meningeome werden von der Weltgesundheitsorganisation (*world health organization* - WHO) in drei Grade eingeteilt [3].

- WHO-Grad I: Meningeome des WHO-Grads I werden auch als *common-type* Meningeome bezeichnet. Sie treten unter allen diagnostizierten Meningeomen am häufigsten auf und werden auf Grund ihres in der Regel langsamen und abgegrenzten Wachstums als benigne Tumore eingestuft.
- WHO-Grad II: Atypische Meningeome zählen zum WHO-Grad II und zeigen häufiger ein invasives Wachstum und eine höhere Rezidivrate als WHO-Grad I Meningeome.
- WHO-Grad III: Zu den malignen Meningeomen des WHO-Grads III werden die am seltensten auftretenden anaplastischen Meningeome gezählt, die mit der schlechtesten Prognose unter allen Meningeomen einhergehen.

Meningeome zählen in der Regel zu den gutartigen intrakraniellen Tumoren, jedoch können sie raumfordernd wachsen und somit Druck auf das angrenzende Hirngewebe ausüben. Daher ist eine frühzeitige Diagnose wichtig um den Tumor bereits zu detektieren, bevor z. B. ein Nachweis mittels bildgebender Verfahren wie der Computer bzw. Magnetresonanztomographie (CT bzw. MRT) möglich ist.

2.2 TXNDC16 - ein Meningeom-assoziiertes Antigen

In der Humangenetik des Uniklinikums Homburg/Saar konnte bereits vor einiger Zeit von Comtesse *et al.* für Meningeome mittels SEREX eine komplexe humorale Immunantwort gezeigt werden, die zur minimal-invasiven Detektion dieser Tumore geeignet ist [4]. Die von Sahin *et al.* entwickelte SEREX-Methode (*serological identification of antigens by recombinant expression cloning*) beruht auf der Herstellung einer cDNA-Expressionsbank in Bakteriophagen über reverse Transkription von

Tumor-mRNA oder von mRNA aus fötalem Gehirngewebe, welches eine große Bandbreite an nicht-gewebespezifischen mRNAs exprimiert [5,6]. Nach Transduktion von *Escherichia coli* Bakterien mit den Bakteriophagen werden diese lysiert und die rekombinant exprimierten Proteine auf einer Trägermembran immobilisiert. Im nächsten Schritt wird die Membran mit einem Serum, oder Pools von mehreren Seren, von Patienten inkubiert, die am zu untersuchenden Tumor erkrankt sind. Sogenannte Autoantikörper aus dem Serum können dann an den jeweiligen Antigenen binden und werden über die Bindung von Reportergruppen-tragenden Sekundärantikörpern gegen humane Immunglobuline detektiert. Nach mehreren Validierungsschritten und anschließender Sequenzierung der positiven Bakterienklone erhält man die entsprechenden DNA-Sequenzen der sogenannten Tumor-assoziierten Antigene (TAAs). Alle mittels SEREX identifizierte TAAs werden in der „Cancer Immunome Database“ (CIDB) niedergelegt [7].

Unter den 57 Meningeom-assoziierten Antigenen, die durch Comtesse *et al.* mithilfe der SEREX-Methode identifiziert und in der Folgearbeit von Keller *et al.* mittels Spotassay und einer höheren Anzahl an Meningeom- und Kontrollseren auf Seroreaktivität untersucht wurden, befanden sich 8 Antigene, die ausschließlich mit Meningeomseren reagierten, jedoch nicht mit Kontrollseren [4,8]. Zu diesen Antigenen gehört das bis zu diesem Zeitpunkt noch uncharakterisierte Genprodukt KIAA1344, später TXNDC16 genannt, gegen das bei Comtesse *et al.* in 50 % der untersuchten Meningeomseren Autoantikörper detektiert wurden. In der Folgearbeit von Keller *et al.* reduzierte sich zwar die Seroreaktivität von TXNDC16 durch Verwendung einer höheren Anzahl an Meningeomseren auf 22 %, jedoch wurde erneut keines der verwendeten Kontrollseren als seropositiv identifiziert. In der anschließenden Arbeit von Keller *et al.* konnte ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von TXNDC16 und der Seroreaktivität gezeigt werden. So stellte sich heraus, dass die Expression von TXNDC16 bei den seropositiven Meningeompatienten um durchschnittlich das Dreifache höher lag als bei seronegativen Meningeompatienten [9]. Weitere Charakterisierungsversuche zur subzellulären Lokalisation, zur Proteinexpression in Meningeomen unterschiedlicher WHO-Grade sowie der Allelstatus verschiedener bekannter Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) im TXNDC16-Gen wurden seit dem durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der von mir verfassten Diplomarbeit „Charakterisierung des

Meningeom-assoziierten Antigens TXNDC16“ im Jahr 2009 zusammengefasst worden [10].

Von insgesamt 28 Meningeompatienten wurde sowohl bei der Tumor-DNA als auch bei der DNA der Leukozyten der Allelstatus dreier nicht-synonymer SNPs in der kodierenden Sequenz von *TXNDC16* ermittelt, die zu der damaligen Zeit in der Literatur niedergelegt waren. Durch nicht-synonyme SNPs werden Basentriplets, sogenannte Codons, dahingehend verändert, dass auf Ebene der Translation eine andere Aminosäure in das entstehende Protein eingebaut wird. Für die beiden im Exon 7 von *TXNDC16* liegenden SNPs (rs28759013, rs28593180) konnten keine Allelunterschiede zwischen der Leukozyten- und Meningeom-DNA festgestellt werden. Lediglich für den im Exon 15 lokalisierten SNP (rs7155490) wurde bei zwei der 28 Meningeompatienten in der Meningeom-DNA ein homozygoter Allelstatus detektiert, während in der entsprechenden Leukozyten-DNA ein heterozygoter Allelstatus vorlag. Laut einer 2008 veröffentlichten Studie, die mittels Immunfluoreszenz die bis dahin noch nicht bekannte subzelluläre Lokalisation vieler Proteine bestimmt hat, ist TXNDC16 ein mitochondrial lokalisiertes Protein [11]. Zur Bestätigung der subzellulären Lokalisation wurde in meiner Diplomarbeit ein Plasmid hergestellt, welches für ein Fusionsprotein von TXNDC16 mit dem grünfluoreszierenden Protein GFP auf carboxyterminaler Seite kodiert. Dieses wurde anschließend in Zellen der Zervixkarzinomzelllinie HeLa transfiziert und exprimiert. Es wurden verschiedene Primärantikörper zur Gegenfärbung der zellulären Kompartimente verwendet und die Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die ursprünglich von Barbe *et al.* postulierte subzelluläre Lokalisation von TXNDC16 in den Mitochondrien konnte in der damaligen Arbeit nicht bestätigt und abschließend geklärt werden. Zur Bestimmung der Expressionsstärke von TXNDC16 in Meningeomgewebe wurden die Tumore einiger Patienten untersucht, deren Seren für die von Keller *et al.* durchgeführten serologischen Untersuchungen verwendet wurden. Die Ergebnisse lassen zwar vermuten, dass die Expression von TXNDC16 mit steigendem WHO-Grad zunimmt, es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von TXNDC16 im Tumor und der Seroreaktivität gegen TXNDC16 im Serum der entsprechenden Patienten festgestellt werden [10].

2.3 Das Immunsystem

Bei einer Immunantwort spielt das erworbene Immunsystem eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, welches die erste Hürde des Organismus darstellt, die es für pathogene Krankheitserreger zu überwinden gilt, bietet das erworbene Immunsystem eine variable Pathogenerkennung mittels Antigen-spezifischer Rezeptoren auf Lymphozyten. Diese werden in zwei Klassen eingeteilt, die T- und die B-Lymphozyten. Damit diese Zellen für die Immunabwehr aktiviert werden, bedarf es Zellen, die den Lymphozyten mitteilen, dass es zu einem pathogenen Befall des Organismus gekommen ist. Diese nennt man antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells* - APC). Zu ihnen zählen die Dendritischen Zellen, die Makrophagen, aber auch die B-Lymphozyten selbst. Pathogen-assoziierte Peptide werden mithilfe von MHC-I bzw. MHC-II-Molekülen (*major histocompatibility complex* - MHC) den naiven T-Lymphozyten präsentiert, die so stimuliert und aktiviert werden. MHC-I-Moleküle tragen pathogene Peptide, die zuvor im Zytosol exprimiert, über das Proteasom abgebaut und über die TAP-Transporter (*transporters associated with antigen processing*) ins ER transportiert wurden. Durch die Präsentation des gebundenen Antigens auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran binden dort die sogenannten CD8-positiven T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten) und töten anschließend die infizierte Zelle. Die MHC-II-Moleküle werden wie die MHC-I-Moleküle im ER exprimiert. Sie werden anschließend in Vesikel verpackt und fusionieren mit Endosomen, die phagozytierte Pathogene oder deren Proteine enthalten, welche endosomal durch Proteasen verdaut werden. MHC-II-Moleküle werden von sogenannten CD4-positiven T-Lymphozyten (T_H1- bzw. T_H2-Lymphozyten) erkannt. Während die T_H1-Lymphozyten Makrophagen zur Abtötung intravesikulärer Bakterien aktivieren, werden antigenpräsentierende B-Lymphozyten durch die T_H2-Lymphozyten zur Sezernierung von Immunglobulinen aktiviert. Immunglobuline, die von aktivierten B-Lymphozyten sezerniert werden, entsprechen dem membranständigen B-Zell-Rezeptor der sezernierenden Zelle, d. h. sie erkennen das gleiche Epitop eines Antigens. Antigene können zum einen Viren oder auch pathogene Mikroorganismen sein, zum anderen Proteine oder chemische Substanzen, die durch sie hergestellt werden. In der Regel werden körpereigene Moleküle vom Immunsystem toleriert. Dies geschieht bereits während der Entstehung der Lymphozyten im Knochenmark. Binden die Oberflächenrezeptoren unreifer Lymphozyten an körpereigene Antigene, werden sie entweder inaktiviert oder die

Zellen sterben ab [12]. Dennoch kommt es in einigen Fällen dazu, dass das Immunsystem die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen verliert. Dies geschieht u. a. in Tumoren, die ebenfalls vom Immunsystem erkannt und unter Umständen eliminiert werden.

2.4 Krebs und Tumor-assoziierte Antigene

Krebs zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Laut einer Studie von Ferlay *et al.* gab es 2012 in Europa ca. 308 (♀) bzw. 430 (♂) Krebsneuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Während bei Männern am häufigsten Prostatakrebs diagnostiziert wird, erkranken Frauen am häufigsten an Brustkrebs [13]. Trotz einer hohen Mutationsrate in den Zellen treten Tumorerkrankungen jedoch eher selten auf, da die betroffenen Zellen verschiedene Reparaturmechanismen durchlaufen oder in Apoptose, den programmierten Zelltod, gehen [14,15]. T-Lymphozyten spielen bei der Erkennung kanzeröser Zellen eine wichtige Rolle, da sie tumorspezifische Antigene erkennen, die an der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden. Es gibt verschiedene Ursachen, die die Erkennung eines Antigens auf Tumorzellen für T-Lymphozyten begünstigen. In Tumoren kommt es oft zu Punktmutationen bestimmter Gene, wodurch auf Grund eines Aminosäureaustauschs oder einer Leserahmenverschiebung Peptide präsentiert werden, die zuvor nicht als körpereigen erkannt und dadurch toleriert wurden. Somasundaram *et al.* zeigten, dass eine Punktmutation im Gen *BRAF* bei Melanompatienten, die eine veränderte subzelluläre Lokalisation des mutierten Proteins bewirkt, eine zytotoxische T-Lymphozytenantwort auslöst [16]. Im Weiteren exprimieren Tumorzellen oftmals fötale bzw. keimzellspezifische Proteine, die auf Grund fehlender MHC-Moleküle auf Keimzellen dem Immunsystem nicht als körpereigen präsentiert werden. Diese TAAs werden als *cancer/testis* Antigene bezeichnet [17]. Darüberhinaus tragen neben einer oftmals fehlregulierten Proteinexpression auch veränderte post-translationale Modifikationen dazu bei, dass Tumore eine Immunantwort auslösen [18,19].

Obwohl Tumore in der heutigen Zeit mittels CT bzw. MRT relativ früh erkannt werden und in der Regel mittels Chemo- und Radiotherapie sowie einer gezielten Resektion behandelt werden, lag die Mortalitätsrate 2012 in Europa bei 129 (♀) bzw. 223 (♂) je 100.000 Einwohner, wobei bei Männern Lungenkrebs und bei Frauen Brustkrebs die häufigsten Todesursachen unter den Tumorerkrankungen darstellen [13]. Oftmals ist

ein Tumor durch fehlende oder spät auftretende Symptomatik erst dann diagnostizierbar, wenn bereits eine Metastasierung des Tumors stattgefunden hat bzw. ein Tumor auf Grund seiner Lokalisation nicht mehr oder nur teilweise reseziert werden kann. Daher setzt die Tumordiagnostik u. a. auf minimal-invasive Verfahren, die den Tumor in möglichst frühen Stadien detektieren oder zumindest auf eine mögliche Tumorerkrankung hindeuten. Eine Möglichkeit ist die Detektion von TAAs im Blut von Patienten. Dies wird in der Prostatakrebs-(PCa)-Frühdiagnostik bereits seit Jahren anhand der Menge des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Blut der Patienten durchgeführt. Die Genauigkeit dieser Methode ist jedoch sehr gering und fehleranfällig, sodass für die PCa-Frühdiagnostik bereits weitere TAAs identifiziert worden sind [20-22].

Auch wenn der Nachweis von TAAs im Blut, wie im Falle des PSAs, weiterhin zum Repertoire der Tumorfrüherkennung gehört, geht man mittlerweile dazu über, Autoantikörper gegen TAAs im Serum von Patienten zu detektieren. Im Gegensatz zu Tumorproteinen, die eine durchschnittliche Halbwertszeit von wenigen Minuten bis mehreren Stunden haben, liegt die durchschnittliche Halbwertszeit von löslichen Immunglobulinen bei wenigen Tagen (IgA, IgM) bis hin zu einigen Wochen (IgG) [23,24]. Eine Möglichkeit zur Identifizierung und Detektion von Autoantikörpern gegen TAAs bietet hier der Proteinmakroarray, eine Membran, auf der eine Vielzahl bekannter TAAs, rekombinant exprimiert in *E. coli*, gespottet sind. Somit kann ein sogenanntes spezifisches Seroreaktivitätsmuster für eine Tumorerkrankung erstellt werden. Dazu werden die Proteinmakroarrays mit Serum von Tumorpatienten und Serum von gesunden Kontrollprobanden inkubiert. Die im Serum enthaltenen Autoantikörper binden an die auf dem Array gebundenen Antigene und können anschließend mit einem Sekundärantikörper, der gegen humane Immunglobuline gerichtet ist, mithilfe einer Reportergruppe detektiert werden. Die serumspezifischen Reaktivitätsmuster werden dann miteinander verglichen und ein Set an Antigenen ausgewählt, anhand dessen man die Gruppe der Tumorpatienten von der Kontrollgruppe bestmöglich unterscheiden kann. Mithilfe der Proteinmakroarray-Technik konnten in der Humangenetik des Uniklinikums Homburg/Saar bereits mehrere Tumorentitäten mit hoher Genauigkeit, Spezifität (Richtignegativrate) und Sensitivität (Richtigpositivrate) von gesunden Kontrollen mittels spezifischer Seroreaktivitätsmuster getrennt werden, u. a. auch Meningeome. Ludwig *et al.* konnten beispielsweise mittels eines Proteinmakroarrays zeigen, dass mithilfe von spezifischen

Seroreaktivitätsmustern die Trennung von Meningeompatienten von Normalkontrollen mit einer Genauigkeit von ca. 94 %, einer Spezifität von ca. 96 % und einer Sensitivität von ca. 92 % möglich ist [25]. Lungentumorpatienten konnten von Leidinger *et al.* mit einer Genauigkeit von ca. 98 %, einer Spezifität von 97 % und einer Sensitivität von ca. 98 % von gesunden Kontrollen getrennt werden [26]. Seroreaktivitätsmuster können nicht nur zur Trennung von Tumorpatienten und gesunden Kontrollen verwendet werden, sondern auch zur Untersuchung bestimmter Tumorentitäten bzw. nicht-tumoröser Pathologien des gleichen Organs. So konnten Ludwig *et al.* mit einer Genauigkeit von ca. 92 % Meningeompatienten von Gliompatienten anhand eines spezifischen Seroreaktivitätsmusters trennen, und Leidinger *et al.* trennten Lungentumorpatienten von Patienten mit nicht-tumorösen Lungenerkrankungen mit einer Genauigkeit von ca. 89 % [26,27]. In der Diagnostik haben die Proteinmakroarrays bisher noch keine Anwendung gefunden, zu hoch ist noch die Rate der falschpositiv bzw. falschnegativ befundeten Patienten.

TAAAs sind nicht nur auf Grund der Möglichkeit sie zur minimal-invasiven Tumordiagnostik einzusetzen von Interesse, im Weiteren spiegeln die TAAAs auch Veränderungen in den Tumorzellen wieder. In vielen Tumoren ist z. B. das Tumorsuppressorgen *TP53* mutiert, was zu einer längeren Halbwertszeit des Proteins p53 im Kern führt und die Zellproliferation erhöht. Autoantikörper gegen p53 wurden beispielsweise bei ca. 15 % der Brustkrebspatienten, bei ca. 25 % der Patienten mit Kolonkarzinom und sogar bei ca. 31 % der Patienten gefunden, die an einem Tumor der Speiseröhre erkrankt waren [28]. Diese Beispiele zeigen, dass Proteine, gegen die Autoantikörper im Blut von Tumorpatienten zu finden sind, sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Entstehung der entsprechenden Tumorerkrankung spielen. Es ist somit essentiell, mehr über die Bedeutung von TAAAs in Tumorzellen in Erfahrung zu bringen, um so die biologischen Ursachen der Tumorentstehung besser zu verstehen. Dies beinhaltet unter anderem die zelluläre Lokalisation in der gesunden bzw. der kanzerösen Zelle, die Funktion des Proteins, die Einbindung in verschiedene Signalwege sowie mögliche Interaktionspartner.

2.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die abschließende Bestimmung der subzellulären Lokalisation von TXNDC16. Die Verwendung bioinformatischer Programme zur *in silico* Bestimmung subzellulärer Lokalisationen („TargetP“, „SignalP“) sagen für TXNDC16 eine hohe Wahrscheinlichkeit voraus, den sekretorischen Weg zu durchlaufen [29,30]. Im Gegensatz dazu konnten Barbe *et al.* eine mitochondriale Lokalisation von TXNDC16 mittels Immunfluoreszenz zeigen, welche allerdings bereits in meiner Diplomarbeit nicht bestätigt werden konnte [10,11]. Zur Klärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurden verschiedene Konstrukte der *TXNDC16*-cDNA hergestellt, TXNDC16 in humanen Zelllinien exprimiert und mittels Immunfluoreszenz- bzw. konfokalmikroskopischen Aufnahmen detektiert. Um die Lokalisation noch mit weiteren, unabhängigen Methoden eindeutig zu zeigen, wurden auch molekulare Shift-Assays sowie FACS-Analysen durchgeführt.

Zur Validierung der Vorhersagen, dass TXNDC16 den sekretorischen Weg durchläuft, wurde versucht, TXNDC16 in Zellkulturüberständen zu detektieren und zu bestimmen, ob TXNDC16 dort ungebunden oder in Exosomen lokalisiert vorliegt. Ebenso sollte die Funktionalität des putativen aminoterminalen Signalpeptids anhand von Deletionsvarianten von TXNDC16 und von Varianten des grünfluoreszierenden Proteins GFP, welche das TXNDC16-Signalpeptid tragen, sowohl mittels Immunfluoreszenz- bzw. konfokalmikroskopischen Aufnahmen als auch mittels einer *in vitro* Synthese der entsprechenden Plasmide nachgewiesen werden. Im Weiteren wurde auch die Funktionalität der carboxyterminalen, aber maskierten ER-Retentionssequenz DKEL untersucht.

Auf Grund der in den Arbeiten von Comtesse *et al.* und Keller *et al.* ermittelten Seroreaktivität von TXNDC16 mit Seren von Meningeompatienten und der fehlenden Seroreaktivität mit Seren von gesunden Kontrollen wurden Arrays mit überlappenden Peptiden von TXNDC16 zur Bestimmung prädominanter Epitope mittels unterschiedlicher bioinformatischer Methoden ausgewertet [4,8].

Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, die zelluläre Rolle von TXNDC16 bei der Meningeomentstehung zu klären.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Medien

Chemikalien und Medien

Aceton
 Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) (37,5:1)
 Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)
 Agar, Bacto™
 Agarose, Ultra Pure™
 Ammoniumperoxodisulfat (APS)
 Ampicillin
 Bovines Serumalbumin (BSA)

 Bromphenolblau
 Calciumchlorid (CaCl₂)
cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail
 Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs)
 Digitonin
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat
 Cellpure™ (Na₂HPO₄·7H₂O)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)
 EDTA Dinatriumsalz Dihydrat
 Eisessig
 Entwickler
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 Fixierer
 Fötales Kälberserum (FCS) (Charge 1243-T)
 Glucose
 Glycerin
 Glycin
 Hefe-Extrakt, Bacto™
 HEPES Cellpure™
Hoechst Staining 33258
 Isopropanol

Hersteller

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 Bio-Rad (Hercules, USA)
 Roche (Basel, Schweiz)
 BD (Le Pont de Claix Cedex, Frankreich)
 Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
 NEB (Ipswich, UK)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 Serva (Heidelberg, Deutschland)
 Roche (Basel, Schweiz)
 Roche (Basel, Schweiz)
 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

 Gibco/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
 Gibco/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 VWR (Radnor, USA)
 Kodak (Rochester, USA)
 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 Kodak (Rochester, USA)
 Biochrom (Berlin, Deutschland)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 Zentrales Chemikalienlager, UdS, Saarbrücken
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 BD (Le Pont de Claix Cedex, Frankreich)
 Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
 VWR (Radnor, USA)

Kaliumacetat (KOAc)	VWR (Radnor, USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Maleimid-Polyethylenglykol (malPEG)	Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
Mangan(II)-Chlorid (MnCl ₂)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Merck (Whitehouse Station, USA)
³⁵ S-Methionin	Zentrales Chemikalienlager, UdS, Saarbrücken
Milchpulver	Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR (Radnor, USA)
Natriumchlorid (NaCl) Cellpure™	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Whitehouse Station, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Zentrales Chemikalienlager, UdS, Saarbrücken
OptiMEM	Gibco/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
Paraformaldehyd	Merck (Whitehouse Station, USA)
Penicillin/Streptomycin (P/S) (100x)	Gibco/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche (Basel, Schweiz)
ProLong® Gold Antifade	Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
Protein Assay	Bio-Rad (Hercules, USA)
4x Roti®-Load	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Saponin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypton, Bacto™	BD (Le Pont de Claix Cedex, Frankreich)
Tween® -20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylencyanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ziegenserum	Dianova (Hamburg, Deutschland)

3.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Enzyme

*Bam*HI (20.000 U_{/ml})
*Bgl*II (10.000 U_{/ml})
*Dpn*I (20.000 U_{/ml})
*Eco*RI (20.000 U_{/ml})

Hersteller

NEB (Ipswich, UK)
NEB (Ipswich, UK)
NEB (Ipswich, UK)
NEB (Ipswich, UK)

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase
 Proteinase K
 S6-RNA-Polymerase
 Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP
 T4-DNA-Ligase
 T4-Polynukleotidkinase, PNK
 T7 RNA-Polymerase
 Taq DNA Polymerase
 Trypsin-EDTA

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
 Roche (Basel, Schweiz)
 Promega (Madison, USA)
 Roche (Basel, Schweiz)
 Promega (Madison, USA)
 Promega (Madison, USA)
 Promega (Madison, USA)
 Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)
 Gibco/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)

Reaktionskits

ECL Prime Western Blotting Detection Reagent
 FuGENE® HD Transfection Reagent
 QIAGEN Plasmid Midi Kit
 QIAprep Spin Miniprep Kit
 QIAquick Gel Extraction Kit
 QIAquick PCR Purification Kit
 TnT® T7 coupled Rabbit Reticulocyte Lysate L4600

GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
 Roche (Basel, Schweiz)
 QIAGEN (Hilden, Deutschland)
 QIAGEN (Hilden, Deutschland)
 QIAGEN (Hilden, Deutschland)
 QIAGEN (Hilden, Deutschland)
 Promega (Madison, USA)

3.1.3 Größenstandards für Agarose- und SDS-Polyacrylamidgele

Bei der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4.2) wurden der DNA-Größenstandard 100 bp *extended* (siehe Abbildung 1A) und die 1 kb DNA-Leiter (siehe Abbildung 1B) verwendet.

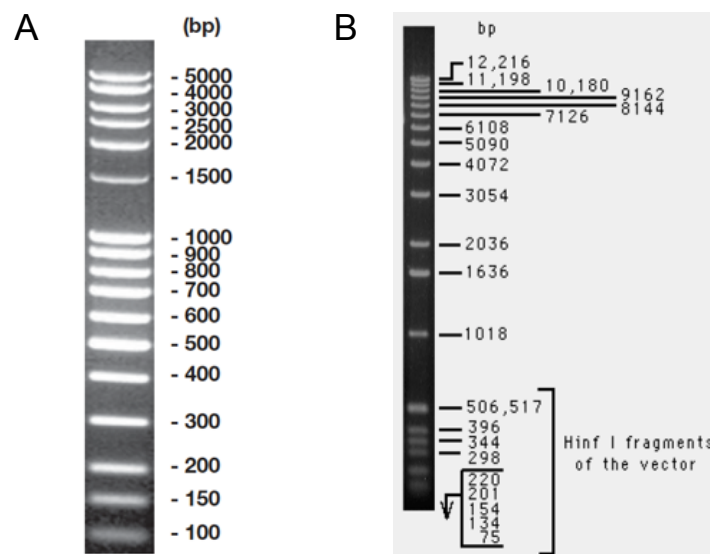


Abbildung 1: DNA-Größenstandards. (A) 100 bp *extended*. (B) 1 kb DNA Leiter (Technical Manuals Carl Roth und Invitrogen).

Bei der SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.5.4) wurde der Protein-Größenstandard *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet (siehe Abbildung 2).

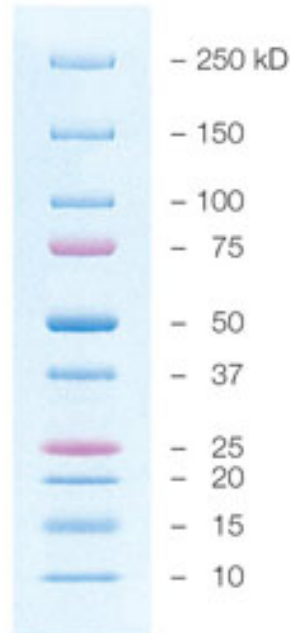


Abbildung 2: Protein-Größenstandard. *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (Bio-Rad, Hercules, USA).

3.1.4 DNA-Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden mithilfe der in Tabelle 1 aufgelisteten Oligonukleotide (Primer) hergestellt. Tabelle 1 enthält außerdem alle verwendeten Colony- bzw. Sequenzierprimer.

Tabelle 1: PCR-Primer zur Herstellung der verschiedenen cDNA-Konstrukte von TXNDC16 und GFP

Primername	Orientierung	Sequenz (5'-3'-Orientierung) ^a	Bemerkung
TXNDC16_EcoRI _full_for	forward	<u>CTCCGAATTC</u> <u>AGGCCACCATGTTTT</u> CCGGCTTCAATGTCCTTAG	Anfügen einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle an TXNDC16 (5'-Ende)
TXNDC16_BamHI _HA_rev	reverse	<u>CCAGGGATCCTCA</u> <u>AGCGTAGTCTGG</u> <u>GACGTCGTATGGGTAGTTCACTTTT</u> GAGCATCCTAACTC	Anfügen einer <i>BamHI</i> -Schnittstelle und eines HA-Tags an TXNDC16 (3'-Ende)
KIAA_woSP_for	forward	<u>CTCCGAATTC</u> <u>AGGCCACCATGTTAC</u> CAGAACTGAGTCCTCAGAA	Deletion des Signalpeptid-kodierenden Sequenz von TXNDC16

^a Restriktionsschnittstellen (unterstrichen), Kozaksequenz (kursiv), cDNA-Bindung des Primers (fett), Tags (kursiv und unterstrichen)

Fortsetzung Tabelle 1:

Primername	Orientierung	Sequenz (5'-3'-Orientierung) ^a	Bemerkung
TXNDC_SPonly _Bam_rev	reverse	<u>CTCCGGATCC</u> AGAGTTTACTGTTGG CATGTAAAAAATGC	Anfügen einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle an die Signalpeptid-kodierende Sequenz von TXNDC16
TXNDC16_aa31_for	forward	CTGAGTCCTCAGAAATATTTTAG	Insertion der myc-Sequenz zwischen den aa30 und aa31 kodierenden Codons von TXNDC16
TX_ins_myc_aa31 _rev	reverse	<u>CAGGTCTTCTTCAGAGATCAGTTTC</u> <u>TGTTCTTCTGGTAAAGAGTTTACTG</u> TTGGC	Insertion der myc-Sequenz zwischen den für aa30 und aa31 kodierenden Codons
TXNDC16_w/o _cTAG_rev	reverse	TCAGTTCACCTTTTGAGCATCC	Tag-Deletion im 3'-Bereich der cDNA von TXNDC16
TXaa28-30_myc_for	forward	TTACCAGAAGAACAGAACTGATCT CTGAAG	Deletion der Signalpeptid-kodierenden Sequenz von TXNDC16
TXNDC16_Δaa820- 25_rev	reverse	TCATAACTCTTTATCACGTCTAAAT G	Deletion der letzten 6 kodierenden Codons der cDNA von TXNDC16
GFP_Eco_ATG_for	forward	<u>CTCCGAATTCAGGCCACCATGGTGA</u> GCAAGGGCGAGGAGCTG	Anfügen einer <i>Eco</i> RI-Schnittstelle an GFP (5'-Ende)
GFP_BamHI_for	forward	<u>CTCCGGATCCGTGAGCAAGGGCGAG</u> GAGCTG	Anfügen einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle an GFP (5'-Ende)
GFP_BglII_rev	reverse	<u>CTCCAGATCTTTACTTGTACAGCTC</u> GTCC	Anfügen einer <i>Bgl</i> II-Schnittstelle an GFP (3'-Ende)
GFP_TXNDC-3'_re	reverse	TTAGTTCACTTTTGAGCATCCTAAC TCTTTATC CTTGTACAGCTCGTCCA TGCCG	Anfügen der letzten 10 kodierenden Codons von TXNDC16 an GFP
GFP_DKEL_rev	reverse	TTATAACTCTTTATC CTTGTACAGC TCGTCCATGCCG	Anfügen der für die ER-Retentionssequenz (DKEL) kodierenden Codons an GFP
pSG5_Eco_Ko _ATG_rev	reverse	CATGGTGGCCTGAATTCGCCC	Deletion der Signalpeptid-kodierenden Sequenz von TXNDC16
pSG5_BglII_for	forward	<u>AGATCTTATTAAAGCAGAAC</u>	Bindung an die pSG5-Vektorsequenz am flankierenden 3'-Bereich eines cDNA-Inserts
pCAG_for	forward	GCAACGTGCTGGTTATTGTG	Colony- und Sequenzierprimer für pSG5 (5'-flankierender Bereich)
EBV_rev	reverse	GATGAGTTTGGACAAACCAC	Colony- und Sequenzierprimer für pSG5 (3'-flankierender Bereich)
TXNDC16-3'_for	forward	GGATGCTCAAAAGTGAAC	Colony-PCR-Primer für pSG5-TXNDC16 am 3'-Ende der TXNDC16-cDNA
PM_74kD_rev	reverse	GTTAAGACAAATTGGTATGTAG	Colony-PCR-Primer im 3'-Bereich des TXNDC16-Signalpeptids

^a Restriktionsschnittstellen (unterstrichen), Kozaksequenz (kursiv), cDNA-Bindung des Primers (fett), Tags (kursiv und unterstrichen)

3.1.5 Vektoren

In Tabelle 2 sind alle in der vorliegenden Arbeit hergestellten und eingesetzten Plasmide sowie die dazu verwendeten Primerpaare aufgelistet. Des Weiteren sind die bei der PCR (siehe Kapitel 3.4.1) zu erwartenden Produktgrößen sowie die Elongationszeiten den jeweiligen PCR-Reaktionen zugeordnet. Außerdem ist angegeben, ob es sich um eine Klonierung über Restriktionsenzyme handelt oder um die Religation eines vollständig amplifizierten linearen Vektors. Die Vektoren, die im Zuge der Diplomarbeit „Untersuchung möglicher funktioneller Domänen des Meningeom-assoziierten Antigens TXNDC16“ von Frau Dipl.-Biol. Tamara Werner am Institut für Humangenetik, Uniklinikum Homburg/Saar, hergestellt wurden sind gesondert gekennzeichnet. Die Klonierungsstrategien aller verwendeten Vektoren sowie die Vektorkarten der eukaryotischen Expressionsvektoren pCMV-SPORT6, pSG5 und pEGFP-N1 sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Abbildungen 24 - 36).

Tabelle 2: Herstellungsparameter der verwendeten Plasmide

Plasmidname ^a	Primerpaare	Elongation [m:s]	Produktgröße [bp]	Klonierung über	Versuche
pSG5-TXNDC16-HA	TXNDC16_EcoRI_full_for TXNDC16_BamHI_HA_rev	1:30	2.533	Restriktion	4.1.1; 4.1.2
pSG5-ΔSP-TXNDC16-HA	KIAA_woSP_for TXNDC16_BamHI_HA_rev	1:30	2.455	Restriktion	4.1.5
pSG5-TXNDC16	pSG5_BgIII_for TXNDC16_wo_cTAG_rev	3:30	6.556	Religation	
pSG5-myc-TXNDC16	TXNDC16_aa31_for TX_ins_myc_aa31_rev	3:30	6.586	Religation	4.1.7; 4.1.8
pSG5-myc-TXNDC16-DKEL	pSG5_BgIII_for TXNDC16_Δaa820-25_rev	3:30	6.568	Religation	4.1.3; 4.1.7
pSG5-ΔSP-myc-TXNDC16	TXaa28-30_myc_for pSG5_Eco_Ko_ATG_rev	3:30	6.508	Religation	4.1.3; 4.1.7
pSG5-GFP	GFP_BamHI_for GFP_BgIII_rev	0:30	748	Restriktion	4.1.5; 4.1.7
pSG5-SP-TX-GFP^b	TXNDC16_EcoRI_full_for TXNDC_SPonly_Bam_rev	0:30	109	Restriktion	4.1.5; 4.1.7; 4.1.8
pSG5-SP-TX-GFP-TX3'	GFP_BamHI_for GFP_BgIII_rev	0:30	737		
pSG5-SP-TX-GFP-TX3'	pSG5_BgIII_for GFP_TXNDC-3'_re	2:30	4.912	Religation	4.1.7
pSG5-SP-TX-GFP-DKEL	pSG5_BgIII_for GFP_DKEL_rev	2:30	4.894	Religation	4.1.7

^a Unterstrichene Plasmide wurden von Frau Dipl.-Biol. Tamara Werner im Zuge ihrer Diplomarbeit am Institut für Humangenetik, Uniklinikum Homburg/Saar, hergestellt.^b Linearisierter Vektor pSG5 sowie die geschnittenen PCR-Produkte für GFP und für das TXNDC16-Signalpeptid wurden in einem Ligationansatz inkubiert.

Tabelle 3 beinhaltet die für die Colony-PCR (siehe Kapitel 3.4.1) verwendeten Primerpaare sowie die zu erwartenden Colony-PCR-Produktgrößen bei erfolgreicher Klonierung mittels Restriktion bzw. Religation (siehe Kapitel 3.4.5 & 3.4.7).

Tabelle 3: Colony-PCR-Primerpaare zur Validierung der pSG5-Klonierungen

Colony-PCR-Primerpaar	Plasmid	Produktgröße [bp]
pCAG_for EBV_rev	pSG5	208
	pSG5-TXNDC16-HA	2.721
	pSG5-ΔSP-TXNDC16-HA	2.643
	pSG5-GFP	930
	pSG5-SP-TX-GFP	1.014
pCAG_for PM_74kD_rev	pSG5-myc-TXNDC16	687
	pSG5-ΔSP-myc-TXNDC16	609
GFP_BamHI_for EBV_rev	pSG5-SP-TX-GFP-TX3'	885
	pSG5-SP-TX-GFP-DKEL	867
TXNDC16-3'_for EBV_rev	pSG5-TXNDC16	149
	pSG5-myc-TXNDC16-DKEL	Kein Produkt

3.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie die jeweiligen Versuchsbedingungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Konzentration ^a
α-α-Tubulin (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:1.000 (FACS)
α-β-Actin (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:1.000 (WB)
α-CD63 (polyklonal, Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:500 (WB)
α-GFP (polyklonal, Kaninchen)	AG Zimmermann (Medizinische Biochemie, UdS)	1:500-1:1.000 (WB)
α-HA (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:400 (IF) 1:500-1:1.000 (WB)
α-myc (polyklonal, Kaninchen)	Abcam (Cambridge, UK)	1:500 (WB)
α-PDI (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz (Dallas, USA)	1:400 (FACS, IF) 1:500-1:1.000 (WB)
α-TXNDC16 (polyklonal, Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:500 (FACS, IF) 1:500-1:1.000 (WB)
Alexa Fluor® 488-conjugated Goat-α-Mouse IgG (H + L)	Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)	1:1.000 (FACS, IF)
Alexa Fluor® 488-conjugated Goat-α-Rabbit IgG (H + L)	Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)	1:1.000 (FACS, IF)
Alexa Fluor® 594-conjugated Goat-α-Rabbit IgG (H + L)	Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)	1:1.000 (IF)

^a Blocking- und Primärantikörperlösungen siehe Herstellerangaben, FACS = *fluorescence activated cell sorting*, IF = Immunfluoreszenz, PA = Peptidarray, WB = Western Blot.

Fortsetzung Tabelle 4:

Antikörper	Hersteller	Konzentration ^a
HRP-conjugated Goat- α -Rabbit IgG (H + L)	Dianova (Hamburg, Deutschland)	1:30.000 (WB)
HRP-conjugated Sheep- α -Mouse IgG (H + L)	Dianova (Hamburg, Deutschland)	1:50.000 (WB)
Cy5-conjugated AffiniPure Rabbit- α - Human IgA + IgG + IgM (H + L)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	1:500-1:5.000 (PA)
Cy5-conjugated AffiniPure Rabbit- α - Human IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	1:1000 (PA)

^a *Blocking*- und Primärantikörperlösungen siehe Herstellerangaben. FACS = *fluorescence activated cell sorting*. IF = Immunfluoreszenz, PA = Peptidarray, WB = Western Blot.

3.1.7 Patientenmaterial

Für die Peptidarrays zur Bestimmung immunogener Epitope von TXNDC16 wurden Seren von 24 Meningeompatienten und von 19 Kontrollprobanden ohne bekannte Erkrankung verwendet. Die Meningeomseren wurden vom Institut für Neurochirurgie, Prof. Dr. J. Oertel, Uniklinikum Homburg/Saar, und die Kontrollseren vom Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Prof. Dr. H. Eichler, Uniklinikum Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt. Alle Blutproben wurden in Serum-Monovetten entnommen und unmittelbar nach Entnahme am Institut für Humangenetik mit 3.000 x g für 10 min zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde bei -70 °C aufbewahrt. In Tabelle 5 sind genauere Angaben der Patientendaten aufgelistet, wie Alter und Geschlecht. Für die Meningeompatienten ist zusätzlich der WHO-Grad des jeweiligen Meningeoms angegeben.

Tabelle 5: Patientendaten der Meningeompatienten (H-Nummer) und der gesunden Kontrollprobanden (N-Nummer)

Serum-Nr.	Geschlecht	Alter bei Entnahme	WHO-Grad
H50	m	55	n. b.
H72	w	67	n. b.
H149	m	56	II
H365	w	69	II
H386	m	70	III
H537	w	71	I
H767	m	67	III
H1003	m	66	I

m = männlich, w = weiblich, n. b. = nicht bekannt

Fortsetzung Tabelle 5:

Serum-Nr.	Geschlecht	Alter bei Entnahme	WHO-Grad
H1093	w	41	I
H1102	w	65	n. b.
H1119	w	59	n. b.
H1129	m	62	I
H1193	w	69	III
H1213	w	73	I
H1239	w	85	III
H1334	w	59	I
H1343	w	67	II
H1359	w	35	II
H1395	w	76	I
H1401	m	65	II/III
H1408	w	63	I
H1410	w	48	I
H1428	w	48	II
H1434	w	74	I
N9	m	61	
N13	w	49	
N20	m	37	
N31	m	39	
N32	m	40	
N34	w	42	
N36	m	32	
N37	w	40	
N38	m	21	
N39	w	39	
N40	m	28	
N41	m	57	
N42	w	33	
N50	m	48	
N220	w	53	
N230	m	26	
N250	w	52	
N260	w	40	
N270	w	44	

m = männlich, w = weiblich, n. b. = nicht bekannt

3.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterial

Hersteller

Amersham (Freiburg, Deutschland)

BD Biosciences (San Jose, USA)

Beckman Coulter (Brea, USA)

BioCision (Mill Valley, USA)

Biometra (Göttingen, Deutschland)

Bio-Rad (Hercules, USA)

Brand (Wertheim, Deutschland)

B.Braun (Welsungen, Deutschland)

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Consort (Turnhout, Belgien)

Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Epson (Suwa, Japan)

GE Healthcare (Uppsala, Schweden)

GFL (Burgwedel, Deutschland)

Greiner BioOne (Frickenhausen, Deutschland)

Heraeus (Hanau, Deutschland)

Hettich (Kirchlengern, Deutschland)

IKA (Staufen, Deutschland)

Infors (Basel, Schweiz)

Intavis (Köln, Deutschland)

Invitrogen/LifeTechnologies (Carlsbad, USA)

Lumenera (Ottawa, Kanada)

Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland)

Geräte und Verbrauchsmaterial

Image Eraser SF mit Exponierplatten

FACScan; FACS-Röhrchen

Polykarbonat-Röhrchen; Rotoren (45 Ti, JLA-8.1000); Ultrazentrifugen (Avanti[®] J-26 XP, Optima[™] L-90K)

CoolCell[™]

Thermocycler (T-Gradient)

Powersupply (Model 200/2.0); Protein Assay

Neubauer-Zählkammer

Thermomix[®] BU

Thermoblock (TCR 100)

Powersupply (E865)

Kühlzentrifuge (5471R); Küvetten (UVette[®])
Photometer (Biophotometer),

Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)

Scanner (Perfection V10)

PVDF-Transferrmembran; Storage Phosphor
Screen Exponierplatten, Typhoon Trio[™];
Whatman[™]-Papier

Schüttelwasserbad

Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml); Reaktionsgefäße
(12 ml, 15 ml, 25 ml); Zellkulturflaschen
(25 cm², 75 cm², 175 cm²); Zellkulturplatten
(6-well, 35 mm, 100 mm, 145 mm)

Tischzentrifuge (Biofuge pico)

Zentrifuge (Rotofix 32)

Magnetrührer (IKAMAG RCT); Schüttler (KS
125 Basic)

Schüttelinkubator (Multitron II)

Peptidarray

Blotting-Kammer (XCell II[™] Blot); Elektropho-
resekammer (XCell SureLock[®] Mini-Cell);
Gelkassetten (1,0 mm)

CCD-Kamera (LU105M)

pH-Meter (SevenEasy)

Millipore (Bedford, USA)	Milliporewasseranlage Milli-Q
Olympus (Tokio, Japan)	Lichtmikroskop (AX70)
	CCD-Kamera (DP71)
Pechiney (Chicago, USA)	Parafilm M
Peqlab (Erlangen, Deutschland)	ArraysScanner (ScanArray Lite)
Perkin Elmer (Waltham, USA)	Spitzen (20 µl, 1.000 µl)
Renner (Dannstadt, Deutschland)	Elektrophoresekammer
Sanyo (Osaka, Japan)	CO ₂ -Inkubator; -70 °C Gefriertruhe (Ultra Low)
Sartorius (Göttingen, Deutschland)	Feinwaage (Basic); Sterilbank (BioHit Polaris); Sterilfilter (0,2 µm);
Sigma (Osterode am Harz, Deutschland)	Kühlzentrifuge (2-16K)
Sorensen Bioscience (Salt Lake City, USA)	Spitzen (10 µl, 200 µl)
Systec (Wettenberg, Deutschland)	Autoklav (VE-150)
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Brutschrank (Jouan); NanoDrop™ 2000
Tritec (Hannover, Deutschland)	Eismaschine
Uniequip (Martinsried, Deutschland)	Vortex (Unimag ZX)
VWR (Radnor, USA)	Deckgläschen (Ø 12mm); Objektträger
Wealtec (Sparks, USA)	Geldokumentation (UV-Transilluminator);
Zeiss (Jena, Deutschland)	Lichtmikroskop (Axiovert 25); SIM-Konfokal- mikroskop (ELYRA)

3.1.9 Software, Online-Tools und Datenbanken

- Amplify 3: *in silico* PCR
(<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>)
- Biomedical PowerPoint Toolkits: Bildelemente zur Erstellung von Abbildungen
(www.motifolio.com)
- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): Abgleich von Nukleotid- und Proteinsequenzen
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- cell^F: Bildbearbeitung der Immunfluoreszenzaufnahmen
(http://www.olympus.de/microscopy/en/microscopy/startpage_misd.jsp)
- CellQuest Pro: Auswertung der Durchflusszytometrie
(<http://www.bdbiosciences.com>)
- ClustalW2: Multiple Sequenz-Alignments
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

- CodonCode Aligner: Auswertung von Chromatogrammen und Sequenzen
(<http://www.codoncode.com/aligner/>)
- DeVision G V2.0: Gel-Dokumentation
(DeCon Science Tec, Hohengandern, Deutschland)
- Endnote X5: Literaturverzeichnis
(<http://endnote.com/>)
- Ensembl: Gen-Datenbank
(<http://www.ensembl.org/index.html>)
- Epson Scan V3.00G: Digitalisierung der Western Blots
(<http://www.epson.com/cgi-bin/Store/support/SupportIndex.jsp>)
- FinchTV V1.5.0: Auswertung von Chromatogrammen und Sequenzen
(<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>)
- FuGENE® HD Protocol Database: Ermittlung der zellspezifischen Transfektionsbedingungen
(<http://www.promega.com/techserv/tools/FugeneHdTool/>)
- ImageJ V1.46r: Bildbearbeitung
(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)
- ImageQuant Software TL 1D V7.0: Bearbeitung der *Phosphorimaging*-Aufnahmen
(http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/de/GELifeSciences-DE/products/AlternativeProductStructure_16016/)
- Microsoft Office Mac 2011: Textverarbeitung (Word), Tabellenverarbeitung (Excel), Erstellung der Abbildungen (PowerPoint)
- NCBI (National Center for Biotechnology Information): Datenbank
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- NEBcutter V2.0: Bestimmung von Restriktionsschnittstellen, Restriktionsenzymssuche, *in silico* Verdau (Vincze, 2003)
(<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)
- ProtParam: Bestimmung physikochemischer Eigenschaften einer Proteinsequenz
(<http://web.expasy.org/protparam/>)
- WoLF PSORT Prediction: Vorhersage der subzellulären Lokalisation eukaryotischer Proteine
(<http://wolfpsort.org/>)
- R: Programmiersprache und Software-Umgebung für statistische Analysen und Grafiken
(<http://www.r-project.org>)

- Reverse Complement: Revers Komplementäre Konvertierung einer DNA-Sequenz (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)
- ScanArray Express: Auswertung der Peptidarraydaten nach Scan mit Arrascanner ScanArray Lite
- SignalP V3.0 und V4.1: Vorhersage von Signalpeptid-Schnittstellen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)
- TargetP V1.1: Vorhersage der subzellulären Lokalisation eukaryotischer Proteine (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)
- Translate: Translation einer Nukleotidsequenz in eine Proteinsequenz (<http://web.expasy.org/translate/>)
- ZEN Lite: Bildbearbeitung der Konfokalaufnahmen (http://microscopy.zeiss.com/microscopy/en_de/products/microscope-software/zen-lite.html)

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultur und Lagerung von Bakterien

LB-Medium:

1 % Trypton
(w/v) Hefe-Extrakt
0,5 % (w/v) NaCl
1 % (w/v) autoklavieren

LB-Agar:

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
1 % (w/v) NaCl
1,5 % (w/v) Agar
autoklavieren

Zur Amplifikation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden diese in *Library Efficiency*[®] *Escherichia coli* DH5 α [™] (Invitrogen; Genotyp: F⁻ ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻) transformiert (siehe Kapitel 3.2.3). Die Bakterien wurden entweder in LB-Medium (*lysogeny broth*) in einem Erlenmeyer-Kolben bei 37 °C aerob in einem Schüttelinkubator mit 225 rpm kultiviert oder zur Gewinnung von einzelnen Kolonien aus Flüssigkultur auf eine LB-Agar-Platte ausplattiert und in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Lagerung von Plasmiden in eine Bakterien-Flüssigkultur wurden 500 μ l der Bakterienkultur in logarithmischer Wachstumsphase mit 500 μ l Glycerin vermischt und bei -70 °C eingefroren.

Zelldichtebestimmung der Bakterienkultur

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde mittels Photometer die optische Dichte der Bakterienkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Dazu wird zunächst eine Küvette mit Kulturmedium als Referenz genommen und anschließend die Bakterienprobe gemessen. Die Berechnung der optischen Dichte erfolgt hierbei nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

Lambert-Beersches Gesetz:

$$E = \log(I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

wobei: E = Extinktion (OD)
 I_0 = Intensität des einfallenden Lichts
 I = Intensität des transmittierten Lichts
 ϵ = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient [$1/(\text{mol} \cdot \text{cm})$]
 d = Schichtdicke der Probe [cm]
 c = molare Konzentration der absorbierenden Substanz [mol/l]

3.2.2 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* DH5 α

TfBI:

30 mM KOAc
 50 mM MnCl₂
 100 mM KCl
 10 mM CaCl₂
 15 % (v/v) Glycerin
 sterilfiltrieren (0,2 μm)

TfBII:

10 mM Na(MOPS)
 75 mM CaCl₂
 10 mM KCl
 15 % (v/v) Glycerin
 sterilfiltrieren (0,2 μm)

SOB-Medium:

2 % (w/v) Trypton
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 10 mM MgCl₂
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 autoklavieren

SOC-Medium:

SOB-Medium
 20 mM Glucose
 sterilfiltrieren (0,2 μm)

Damit Bakterien Plasmid-DNA aufnehmen können (siehe Kapitel 3.2.3) müssen sie kompetent gemacht werden. Dies geschieht durch einen Überschuss an Chloridionen, wodurch die bakteriellen Zellwände permeabilisiert werden. Dazu wurde eine 3 ml Bakterienkultur in LB-Medium ü. N. bei 37 °C mit 225 rpm inkubiert und anschließend in 500 ml SOB-Medium überführt. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C mit 225 rpm kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Die Kultur wurde anschließend auf Eis abgekühlt und die Bakterien mit 4.000 x g für 15 min bei 4 °C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 100 ml kaltem TfBI-Medium resuspendiert und die Bakterien mit 4.000 x g für 8 min bei 4 °C erneut pelletiert. Zum Schluss wurde das

Pellet in 20 ml kaltem TfbII-Medium resuspendiert, in Kryogefäße zu je 500 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

3.2.3 Transformation von *Escherichia coli* DH5α

Nach der Herstellung chemokompetenter Bakterien (siehe Kapitel 3.2.2) wurde die Plasmid-DNA in die Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Dabei wird über eine schnelle Erhöhung der Temperatur die Permeabilität der Bakterienzellwand und damit die Aufnahmefähigkeit der Bakterien für Plasmid-DNA erhöht. Zunächst wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA zu 50 µl kompetenten *E. coli* DH5α gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert, um eine Anlagerung der Plasmide an die Bakterienzellwand zu gewährleisten. Anschließend wurden die Bakterien für 45 s in ein 42 °C-Wasserbad überführt und danach sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Zum Schluss wurden verschiedene Mengen des Transformationsansatzes auf Antibiotika-haltige LB-Agar-Platten ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert bis einzelne Kolonien deutlich zu erkennen waren.

3.2.4 Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen

Unter Plasmiden versteht man zirkuläre doppelsträngige DNA. Sie sind wenige Kilobasenpaare groß und besitzen u. a. einen Replikationsursprung (*origin of replication*), sodass sie in Bakterien autonom vermehrt werden können, sowie ein Resistenzgen, wodurch Plasmid-tragende Bakterien mittels Antibiotika selektioniert werden können. Darüberhinaus beinhalten sie einige regulatorische Elemente, wie beispielsweise Promotoren für eine Proteinexpression sowie eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site* - MCS), einen Bereich, der viele Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthält, was das Einfügen weiterer DNA, z.B. einer Gensequenz, ermöglicht.

Plasmidisolierung mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit

Die Plasmidisolierung erfolgte mittels des *QIAprep® Spin Miniprep Kits* (QIAGEN) zur anschließenden Sanger-Sequenzierung (siehe Kapitel 3.4.9). Das Prinzip dieser Aufreinigung beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der anschließenden Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentration [31]. Für jeden Transformationsansatz (siehe Kapitel 3.2.3) wurden zunächst mehrere Bakterienkolonien von der LB-Platte mit sterilen Pipettenspitzen gepickt, diese jeweils in 1 - 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und ü. N. mit 225 rpm bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde danach mit 6.000 x g für 15 min bei RT pelletiert. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung nach Herstellerangaben.

Plasmidisolierung mittels QIAGEN® Plasmid Midi Kit

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA für eine anschließende Transfektion in eukaryotischen Zellen (siehe Kapitel 3.3.3) wurden die Plasmid-tragenden Bakterien in 25 ml Kulturen vermehrt und die Plasmide mithilfe des *QIAGEN® Plasmid Midi Kit* (QIAGEN) isoliert. Die Aufreinigung beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien, jedoch mit anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine Matrix unter Niedrigsalz- und pH-Bedingungen. Dazu wurde zunächst eine 25 ml-Übernacht-Kultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C und 225 rpm inkubiert und anschließend mit 6.000 x g für 15 min bei RT pelletiert. Die Plasmidaufreinigung wurde anschließend nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultur und Lagerung eukaryotischer Zellen

Kultivierung eukaryotischer Zellen

Es wurden adhärent wachsende humane Zelllinien verwendet, deren Subkultivierungsbedingungen in Tabelle 6 aufgelistet sind.

Tabelle 6: Verwendete humane Zelllinien und die Bedingungen der Subkultivierung

Zelllinie	Herkunft	Verdünnung	Versuch ^a	Kapitel	Literatur
HeLa	Zervixkarzinom	1:5 – 1:10	FACS, IF, P, Ü, PEG	4.1.1; 4.1.3 - 4.1.6	[32]
HEK293	Embryonale Nierenzellen	1:10 - 1:20	Exo, P, Ü, PEG	4.1.6 - 4.1.8	[33]
Ben-Men-1	Benignes Meningeom	1:20 - 1:30	P, Ü	4.1.6	[34]
HBL-52	Benignes Meningeom	1:10 - 1:20	P, Ü	4.1.6	[35]
IOMM-Lee	Malignes Meningeom	1:10 - 1:20	P, Ü	4.1.6	[36]

^a Exo = TXNDC16 in Exosomen, FACS = *fluorescence activated cell sorting*, IF = Immunfluoreszenz, P = TXNDC16 in Proteinlysaten, PEG = Subzelluläre Lokalisation mittels Maleimid-Polyethylenglykol, Ü = TXNDC16 in Zellkulturüberständen

Die humanen Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) in einem Brutschrank bei 37 °C, ca. 80 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Konzentration kultiviert. Das Nährmedium wurde zusätzlich mit 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum* - FCS) und zur Vermeidung von bakterieller Kontamination mit 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) versetzt. Das FCS wurde zuvor für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Bevor die Zellen eine 100 %-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie subkultiviert, mindestens zweimal wöchentlich. Bei der Subkultivierung wurde zunächst das verbrauchte Nährmedium von den adhären Zellen entfernt und diese vorsichtig mit DPBS gewaschen. Nach Entfernung des Puffers wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung nach kurzer Inkubation im Brutschrank vom Kulturschalenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versetzt um das Trypsin zu inaktivieren und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren zu vereinzeln. Ein Teil der Zellsuspension wurde dann in eine neue Kulturschale mit frischem Nährmedium überführt.

Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Einfriermedium:

60 % (v/v) DMEM

30 % (v/v) FCS

10 % (v/v) DMSO

Eukaryotische Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196 °C langzeitgelagert werden. Das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert dabei die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren, die die Zellmembranen zerstören würden. Für die Kryokonservierung der verwendeten eukaryotischen Zellen wurde zunächst das Nährmedium von den adhärent wachsenden Zellen entfernt und diese anschließend mit DPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA vom Schalenboden gelöst und mit frischem Nährmedium mit 300 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde dann entfernt und das Zellpellet anschließend in DPBS resuspendiert und erneut mit 300 x g für 5 min pelletiert. Zum Schluss wurden die pelletierten Zellen vorsichtig in Einfriermedium resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Die Zellen wurden dann mit einer konstanten Abkühlrate von 1 °C pro Minute bei -70 °C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff asserviert.

Auftauen kryokonservierter Kulturen

Beim Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen mit frischem Nährmedium überführt und anschließend mit 300 x g für 5 min zentrifugiert um DMSO aus dem Medium zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in frischem Nährmedium resuspendiert und in ein neues Kulturgefäß überführt.

3.3.2 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde mithilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) durchgeführt. Eine schematische Darstellung der Oberfläche der Zählkammer ist in Abbildung 3 zu sehen. Zunächst wurden 10 µl einer Zellsuspension zwischen die Zählkammer und ein Deckgläschen pipettiert. Der Abstand zwischen der Zählkammer und dem Deckgläschen beträgt 0,1 mm. Anschließend wurde mikroskopisch die Zellzahl in den vier Großquadraten (1 mm x 1 mm) mit jeweils 16 Kleinquadraten (0,25 mm x 0,25 mm) bestimmt und der

Mittelwert eines Großquadrats bestimmt. Über jedem Großquadrat befindet sich ein Volumen von 0,1 µl (10^{-4} ml).

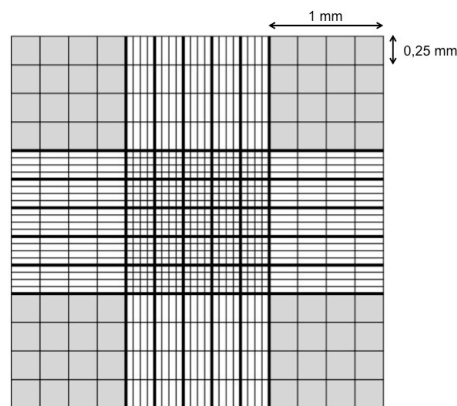


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Oberfläche einer Neubauer-Zählkammer. Für die eukaryotische Zellzählung dienen die vier großen Quadrate (1 mm x 1 mm, grau) mit den jeweils 16 kleinen Quadraten (0,25 mm x 0,25 mm).

Für die Berechnung der Konzentration an Zellen in der Suspension gilt somit:

$$\frac{x \text{ (Anzahl der Zellen pro Großquadrat)}}{10^{-4} \text{ ml}} = x \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml Zellsuspension}}$$

3.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Plasmid-DNA kann über verschiedene Wege in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Zwei Transfektionsmethoden werden im Folgenden näher erklärt, zum einen die Transfektion der Zellen mittels kationischen nicht-liposomalen Lipiden (FuGENE® HD) und zum anderen die Calciumphosphat-Transfektion.

Transfektion mittels FuGENE® HD

Bei der Transfektion mit FuGENE® HD bilden die im Transfektionsreagenz enthaltenen Lipide und Polymere Mizellen, wobei die negativgeladene Plasmid-DNA sich an die positivgeladene Oberfläche der Mizellen anlagern kann und über den endozytotischen Weg in die zu transfizierende Zelle aufgenommen wird. In Tabelle 7 sind die Transfektionsbedingungen der verwendeten Zelllinien aufgelistet.

Tabelle 7: Transfektionsbedingungen der verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Zelllinie	Schale	Zellzahl	Volumen	DNA	OptiMEM ^a	FuGENE [®] HD	FuGENE:DNA
HeLa	Ø 35 mm ^b	3 x 10 ⁵	3 ml	3,3 µg	155 µl	9,9 µl	3:1
HeLa	Ø 100 mm	2 x 10 ⁶	17 ml	19 µg	879 µl	56 µl	3:1
HEK293	Ø 100 mm	3 x 10 ⁶	17 ml	19 µg	879 µl	56 µl	3:1

^a DNA-Konzentration in OptiMEM beträgt 20 ng/µl^b 1 Well einer 6-well-Platte

Zunächst wurden die Zellen einen Tag vor Transfektion in gewünschter Zelldichte ausgesät. Die zu transfizierenden Plasmide wurden dann in OptiMEM in der benötigten Konzentration verdünnt und die entsprechende Menge FuGENE[®] HD zur Plasmidlösung hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde vorsichtig durch Pipettieren gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und schließlich tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Ein Mediumwechsel war bei der Transfektion mit FuGENE[®] HD nicht notwendig.

Calciumphosphat-Transfektion von HEK293-Zellen

HBS (2x):

280 mM NaCl Cellpure™

1,5 mM Na₂HPO₄·7H₂O

50 mM HEPES Cellpure™

pH 7,05

sterilfiltrieren (0,2 µm)

Bei der Calciumphosphat-Transfektion bilden sich bei Vermischung eines Phosphatpuffers (HBS) und CaCl₂ Calciumphosphat-Präzipitate, an die die Plasmide binden können. Nach Zugabe der Präzipitate zu den Zellen werden diese über Endozytose aufgenommen. In Tabelle 8 sind die Bedingungen der Calciumphosphat-Transfektion für HEK293-Zellen aufgeführt.

Tabelle 8: Transfektionsbedingungen der Calciumphosphat-Transfektion für HEK293-Zellen

Schale	Zellzahl	Volumen	DNA	H ₂ O _{dd} ^a	CaCl ₂ (2 M)	2x HBS
Ø 100 mm	3 x 10 ⁶	16 ml	20 µg	1,88 ml	240 µl	1,88 ml
Ø 145 mm	7 x 10 ⁶	40 ml	50 µg	4,7 ml	600 µl	4,7 ml

^a Endvolumen Plasmid-DNA in H₂O_{dd}

Zunächst wurden die Zellen einen Tag vor Transfektion in gewünschter Zelldichte ausgesät. Die zu transfizierenden Plasmide wurden dann in H₂O_{dd} in der benötigten

Konzentration verdünnt. Anschließend wurde tropfenweise unter ständigem Vortexen CaCl_2 zur Plasmidlösung gegeben. Danach wurde der HBS-Puffer (*HEPES buffered saline*) ebenfalls tropfenweise unter ständigem Vortexen zum Plasmid- CaCl_2 -Ansatz gegeben. Der Transfektionsansatz wurde dann für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dieser dann tropfenweise zu den Zellen pipettiert und die Zellen ü. N. bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um verbliebene Calciumphosphat-Kristalle zu entfernen.

3.3.4 Ernte der Zellkulturüberstände

Die Zellkulturüberstände wurden mit einer Pipette abgenommen, in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte gereinigt. Vitale Zellen wurden mit 300 x g für 10 min pelletiert. Anschließend wurden tote Zellen mit 2.000 x g für 10 min und Zelltrümmer mit 10.000 x g für 30 min aus dem Überstand entfernt. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4 °C statt. Die gereinigten Überstände wurden entweder für eine spätere Bearbeitung bei -70 °C gelagert oder für die Exosomenisolierung bzw. Proteinfällung (siehe Kapitel 3.5.2) weiter bearbeitet.

Exosomenisolierung mittels Ultrazentrifugation

Die ca. 40 bis 100 nm großen Exosomen wurden aus dem Zellkulturüberstand durch Ultrazentrifugation gewonnen. Die Zellen wurden hierbei permanent in Exosomen-freiem Nährmedium kultiviert. Dazu wurde das FCS, mit dem das Nährmedium generell supplementiert wird, ü. N. mit 100.000 x g bei 4 °C ultrazentrifugiert. Für die Isolierung der Exosomen wurde der Überstand nach den oben aufgeführten Zentrifugationsschritten in ein Polykarbonatröhrchen überführt und mit 100.000 x g für 1 h bei 4 °C ultrazentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Exosomenpellet in frischem DPBS resuspendiert. Es folgte eine weitere Ultrazentrifugation mit 100.000 x g für 1 h bei 4 °C. Das gewaschene Exosomenpellet wurde in 50 - 100 µl DPBS mit Protease-Inhibitoren (*cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail*) resuspendiert und bei -70 °C gelagert.

3.3.5 Immunfluoreszenz-Färbung

PSS:

DPBS

0,1 % (w/v) Saponin

1 % (v/v) Ziegenserum

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation spezifischer Proteine in Zellkompartimenten bzw. zur Ermittlung von Co-Lokalisationen wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein Primärantikörper an das Epitop eines zu detektierenden Moleküls innerhalb der Zelle. Ein Fluorochrom-tragender Sekundärantikörper bindet anschließend an der schweren Kette des Primärantikörpers. Mithilfe eines Fluoreszenz- (Lichtmikroskopie) bzw. eines Konfokalmikroskops (z. B. *simultaneous laser light stimulation and imaging* - SIM) kann dann das Fluorochrom angeregt und die emittierte Wellenlänge detektiert werden.

Für die Immunfluoreszenz wuchsen die Zellen zunächst auf Glasplättchen, welche sich in der Zellkulturschale befanden. Bevor die Zellen eine 100 %-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in DPBS für 20 min bei 4 °C fixiert. Dadurch werden die zellulären Proteine quervernetzt und die Zellen konserviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min bei 4 °C mit DPBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran und der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit PSS für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Primärantikörper, in PSS verdünnt, auf die Zellen gegeben und diese für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal für jeweils 15 min mit PSS gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit Sekundärantikörpern, verdünnt in PSS. Dieser und alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu vermeiden. Die Zellen wurden anschließend zur Färbung des Zellkerns für 5 min mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258 inkubiert und danach dreimal für jeweils 5 min mit PSS gewaschen. Die Glasplättchen wurden dann mit ProLong® Gold Antifade auf Objektträger überführt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die spezifischen Antikörperkonzentrationen sind in Tabelle 4 unter Kapitel 3.1.6 aufgelistet.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops AX70 (Olympus) und einem Öl-Immersionsobjektiv (Olympus) mit 100-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit der CCD-Kamera DP71 (Olympus) und die Auswertung der Bilder mit der Software „cell[^]F“. Die Konfokalaufnahmen wurden unter Anleitung von Herrn PD Dr. Elmar Krause am Institut für zelluläre Neurophysiologie, AG Prof. Dr. J. Rettig, Universität des Saarlandes, Uniklinikum Homburg/Saar, mittels SIM-Mikroskopie durchgeführt und mit der Software „ZEN Lite“ ausgewertet.

3.3.6 Durchflusszytometrie

FACS (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine Methode zur Separation von Zellen einer Zellsuspension [37,38]. Dabei werden die Zellen vereinzelt und mithilfe eines Laserstrahls jeweils einzeln gemessen. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* - FSC) korreliert hierbei mit der Größe der gemessenen Zelle. Zusätzlich wird die Intensität der Fluoreszenz gemessen um die Bindung spezifischer Antikörper an Oberflächen- bzw. intrazellulären Proteinen zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von TXNDC16 verwendet.

Zunächst wurden aus drei Zellkulturflaschen (75 cm²) die HeLa-Zellen geerntet (ca. 4×10^7), mit 10 % FCS/DPBS vereinzelt und anschließend mit 2 % PFA/DPBS fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit 3 % BSA/DPBS gewaschen und mit 300 x g für 5 min pelletiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 20 µM Digitonin bzw. 0,1 % Triton X-100 (jeweils in 3 % BSA/DPBS) für 30 min bei RT. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der HeLa-Zellen nicht permeabilisiert. Während das Detergenz Triton X-100 alle Membranen der Zelle permeabilisiert, permeabilisiert Digitonin selektiv nur die Plasmamembran. Die permeabilisierten Zellen wurden dann mit 2 µM bzw. 0,01 % Triton X-100 (jeweils in 3 % BSA/DPBS) zweimal gewaschen und mit 300 x g für 5 min pelletiert. Die Zellen wurden anschließend für 30 min bei RT mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit 3 % BSA/DPBS (je 300 x g, 5 min). Danach wurden die Zellen mit Fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach erneut dreimal mit 3 % BSA/DPBS gewaschen (je 300 x g, 5 min) und das Pellet in 1 ml 1 % PFA/DPBS resuspendiert. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Anleitung von Frau Ruth Nickels am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, AG

Prof. Dr. M. Menger, Universität des Saarlandes, Uniklinikum Homburg/Saar, mithilfe des Durchflusszytometers „FACScan“ und der Software „CellQuest Pro“. Die entsprechenden Primär- und Sekundärantikörper sowie die gewählten Konzentrationen sind in Tabelle 4 im Kapitel 3.1.6 aufgelistet.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction - PCR*)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction - PCR*) können spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* vervielfältigt werden [39,40]. Diese kann sowohl bei genomischer DNA als auch auf Plasmidebene durchgeführt werden. Die PCR besteht aus drei Schritten, die mehrfach hintereinander ablaufen und in einem Thermocycler durchgeführt werden: Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen DNA; *Annealing*, also das Anlagern flankierender Oligonukleotide (Primer) an ihre komplementäre Sequenz; Elongation, also die Verlängerung der Oligonukleotid-Primer durch eine DNA-abhängige Polymerase. Für PCR-Produkte, die für eine spätere Klonierung amplifiziert werden, wird eine DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion (*proofreading*) zur Vermeidung des Einbaus falscher Nukleotide verwendet.

Der Ansatz sowie die Bedingungen der PCR-Reaktion erfolgten dabei nach folgendem Schema:

Ansatz:

100 ng DNA-Template
 10 µl 5x Phusion Puffer HF (7,5 mM MgCl₂)
 2,5 µl Vorwärts-Primer (10 µM)
 2,5 µl Rückwärts-Primer (10 µM)
 0,5 µl dNTPs (je 20 mM)
 0,5 µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)
 ad 50 µl H₂O_{dd}

Programm:

3 min	98 °C	} 30 Zyklen
30 s	98 °C	
30 s	55 °C	
X s	72 °C	
10 min	72 °C	

Als Elongationszeit (X) wurde für die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase eine Syntheserate von 2.000 bp pro 1 min zu Grunde gelegt. Die Nukleotidsequenz der verwendeten Primer sowie die spezifischen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 im Kapitel 3.1.4 bzw. 3.1.5 aufgelistet.

Colony-PCR

Mithilfe der Colony-PCR können nach Transformation (siehe Kapitel 3.2.3) und Ausplattieren auf LB-Agar-Platten einzeln gewachsene Bakterienkolonien auf korrekte Insertion der Fremd-DNA (Insert) in den Vektor überprüft werden. Es werden dabei zwei Primer gewählt, von denen einer im flankierenden Bereich des Inserts und ein zweiter im Insert selbst bindet.

Der Ansatz sowie die Bedingungen der Colony-PCR-Reaktion erfolgten dabei nach folgendem Schema:

Ansatz:

1 gepickte Kolonie
 2 µl 10x PCR Rxn Buffer (minus MgCl₂)
 1 µl MgCl₂ (50 mM)
 1 µl Vorwärts-Primer (10 µM)
 1 µl Rückwärts-Primer (10 µM)
 0,2 µl dNTPs (je 20 mM)
 0,12 µl *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl)
 ad 20 µl H₂O_{dd}

Programm:

3 min	94 °C	} 25 Zyklen
45 s	94 °C	
30 s	55 °C	
X s	72 °C	
10 min	72 °C	

Als Elongationszeit (X) wurde für die *Taq* DNA Polymerase eine Syntheserate von 1.000 bp pro 1 min zu Grunde gelegt. Die für die Colony-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3 im Kapitel 3.1.5 aufgelistet.

3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Laufpuffer (50x):

1 M Eisessig
50 mM EDTA
2 M Tris-HCl, pH 8,0

DNA-Ladepuffer (10x):

10 % (v/v) 10x TAE-Laufpuffer
70 % (v/v) Glycerin
20 % (v/v) 20 mM EDTA, pH 8,0
Bromphenolblau
Xylencyanol

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt.

Das Polysaccharid Agarose wird dabei mit einer Konzentration von 0,5 - 1,5 % in 1x TAE-Laufpuffer durch Erwärmen gelöst und vor Polymerisierung mit Ethidiumbromid (0,1 - 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Durch Anlegen einer Spannung wandert die DNA entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die Agarosematrix. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert durch Anregung mit ultravioletterem Licht.

3.4.3 Aufreinigung doppelsträngiger DNA

Amplifizierte DNA-Fragmente können direkt mittels eines *QIAquick® PCR Purification Kits* aufgereinigt werden, wenn die verwendeten Primer die Amplifikation eines spezifischen PCR-Produkts ermöglichen. Falls mehrere PCR-Produkte unterschiedlicher Größe gebildet werden, kann das spezifische Produkt über ein Agarosegel separiert und mittels eines *QIAquick® Gel Extraction Kits* aufgereinigt werden. Die Verwendung beider Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.4 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsmessung doppelsträngiger DNA erfolgte mithilfe des „NanoDrop™ 2000“ Spektralphotometers. Es wurden 0,5 - 2 μl der Probe auf die Messoberfläche pipettiert. Durch Absenkung des Messarms entsteht auf Grund der Oberflächenspannung eine Flüssigkeitssäule definiter Länge, durch die der Lichtstrahl

hindurchgeht. Für die DNA-Konzentration wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.4.5 Verdau von doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen werden verwendet um DNA an spezifischen Stellen unter Spaltung von Phosphodiesterverbindungen der Nukleotide zu trennen. Dabei werden meist die Restriktionsendonukleasen des Typs II benutzt, da diese nur an ihrer charakteristischen Erkennungssequenz binden. Diese Erkennungssequenzen sind meistens palindromische Sequenzen und werden entweder glatt geschnitten (*blunt ends*) oder mit Überhängen (*sticky ends*). Für eine gerichtete Klonierung von Fremd-DNA in einen Vektor werden daher meistens zwei Restriktionsenzyme verwendet, die unterschiedliche Überhänge bilden.

Das Restriktionsenzym *DpnI* ist ein Vertreter der Restriktionsendonukleasen des Typs IV und schneidet methylierte DNA wie beispielsweise bakteriell amplifizierte Plasmide. Dieses Enzym wird in der Regel nach der Aufreinigung von PCR-Produkten eingesetzt um die oft als Template benutzte Plasmid-DNA zu verdauen. Ein Restriktionsansatz ist im Folgenden dargestellt:

Ansatz:

1 µg DNA
 2 µl Puffer (Enzym-abhängig)
 1 µl Restriktionsenzym
 2 µl BSA (10^4 µg/µl) (Enzym-abhängig)
 ad 20 µl H₂O_{dd}

Der Ansatz wurde für 1 - 2 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

3.4.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Nach der Restriktion des PCR-Produkts und des zirkulären Vektors mit den für die Klonierung entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe Kapitel 3.4.5), muss der linearisierte Vektor zunächst mit einer Phosphatase dephosphoryliert werden. Durch

den Restriktionsverdau verbleiben am 5'-Ende der Plasmid-DNA Phosphate wodurch der Vektor religiert werden könnte. Der Dephosphorylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Ansatz:

1 µg Linearisierter Vektor
 3 µl 10x SAP-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 M MgCl₂; 1 mg/ml BSA)
 3 µl SAP, *shrimp alkaline phosphatase* (1 U/µl)
 ad 30 µl H₂O_{dd}

Der Dephosphorylierungsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

3.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor-DNA und ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Fragment, welche durch die gleichen Restriktionsenzyme geschnitten wurden (siehe Kapitel 3.4.5), können über komplementäre Bindung der *sticky ends* zu einem zirkulären Plasmid ligiert werden. Die Lücke des Zucker-Phosphatrückgrats wird dabei durch die Ligase kovalent geschlossen. Die Berechnung der einzusetzenden Menge an PCR-Produkt pro definierter Menge Vektor-DNA erfolgt durch die Formel:

$$x \text{ ng (PCR-Produkt)}^* = \frac{\text{bp (PCR-Produkt)} \cdot \text{ng (Vektor-DNA)}}{\text{bp (Vektor-DNA)}}$$

*Verhältnis PCR-Produkt : Vektor = 3 : 1

Für die Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

Ansatz:

100 ng Linearisierter, dephosphorylierter Vektor
 x ng PCR-Produkt
 1 µl Ligasepuffer (300 mM Tris-HCl, pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 10 mM ATP)
 1 µl T4-DNA-Ligase (3 U/µl) (Promega)
 ad 10 µl H₂O_{dd}

Der Ligationsansatz wurde ü. N. bei 4 °C inkubiert und anschließend in die Transformation (siehe Kapitel 3.2.3) eingesetzt.

3.4.8 Phosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA

Einige der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte wurden nicht durch Klonierung eines Restriktionsansatzes und anschließender Ligation in einen linearisierten Vektor hergestellt, sondern indem eine PCR-Reaktion so gewählt wurde, dass ein vorliegendes Plasmid unter Anfügen zusätzlicher Nukleotide komplett amplifiziert wurde. Nachdem das PCR-Produkt mittels *PCR Purification Kit* aufgereinigt und das Template mittels *DpnI* verdaut wurde (siehe Kapitel 3.4.3 & 3.4.5), wurden anschließend an den beiden 5'-Enden die auf Grund der unphosphorylierten Primer fehlenden Phosphatreste durch eine Kinase angefügt und das linearisierte Plasmid über *blunt ends* religiert (siehe Kapitel 3.4.7). Der Dephosphorylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Ansatz:

- 1 µg Unphosphorylierter linearisierter Vektor (*DpnI* verdaut)
- 3 µl 10x Kinasepuffer
- 3 µl ATP (10 mM)
- 1 µl T4-Polynukleotidkinase (1 U/µl)
- ad 30 µl H₂O_{dd}

Der Phosphorylierungsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

3.4.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Nach der Transformation der kompetenten Bakterien mit dem Ligationsansatz und anschließender Colony-PCR, wurde eine positive Kolonie ü. N. in LB-Medium mit Antibiotikum kultiviert. Die amplifizierten Plasmide wurden danach mittels *QIAprep® Spin Miniprep Kit* aufgereinigt und die Plasmid-DNA sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Seq-IT GmbH (Kaiserslautern) nach der Methode von Sanger *et al.* [41]. Dazu wird eine Sequenzierungsansatz mit einem Primer durchgeführt, der im flankierenden 5'- bzw. 3'-Bereich der zu sequenzierenden DNA bindet. Im

Reaktionsansatz befinden sich neben den Desoxynukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs), die auf Grund des Fehlens einer 3'-Hydroxygruppe an der Ribose einen Abbruch der Synthese der DNA-Fragmente durch die DNA-Polymerase bewirken. Die Analyse der Sequenzierdaten wurde mit der Software „CodonCode Aligner“ durchgeführt.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen

Lysepuffer:

300 mM NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

0,5 % (v/v) Triton X-100

1 Tablette *cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail* in 10 ml Puffer

Zur Proteinisolierung aus Gesamtzelllysat wurden die Zellen nach Trypsinierung in frisches Nährmedium überführt und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden mit 1.200 x g für 5 min pelletiert und anschließend in Lysepuffer resuspendiert (200 µl Lysepuffer je 1×10^7 Zellen). Die Zellen wurden für 20 min auf Eis lysiert und danach mit 20.000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.5.3).

3.5.2 Proteinfällung aus Zellkulturüberständen

Um Proteine aus Zellkulturüberständen zu isolieren, wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) und Aceton durchgeführt.

Zu neun Volumen Zellkulturüberstand wurde ein Volumen TCA (100 %) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit 15.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet in 300 µl Aceton aufgenommen. Danach wurde der Ansatz mit 20.000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und das Proteinpellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde dann in 50 - 100 µl DPBS mit Protease-Inhibitoren (*cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail*) resuspendiert und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.5.3).

3.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration existieren mehrere Methoden, von denen u. a. der Bradford-Assay, eine kolorimetrische Messung, sowie die Spektrophotometrie angewandt wurden.

Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Messung der Proteinkonzentration einer Lösung [42]. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau mit Proteinen. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm [43]. Der Vorteil dieser Methode liegt in der relativ hohen Sensitivität von 1 - 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Je nach Pufferzusammensetzung können jedoch bestimmte Detergenzien die Messung stören [44]. Zunächst wurde eine Proteineichgerade mit Rinderserumalbuminlösung (*bovine serum albumin* - BSA) hergestellt. Die verwendeten BSA-Endkonzentrationen sowie das Pipettierschema sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Pipettierschema der BSA-Eichgerade zur Verwendung im Bradford-Assay

BSA-Endkonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	H ₂ O _{dd} [μl]	BSA-Stammlösung ^a [μl]
0	800	0
1	799	1
2	798	2
5	795	5
10	790	10
15	785	15
20	780	20

^a BSA-Stammkonzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Von den zu messenden Proteinlösungen wurde jeweils 1 μl mit 799 μl H₂O_{dd} vermengt. Zu den Proteinverdünnungen und den Ansätzen der BSA-Eichgerade wurden anschließend 200 μl Bio-Rad Protein Assay pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Absorption bei 595 nm erfolgte mittels „NanoDrop™ 2000“.

Proteinbestimmung mittels A280-Methode

Für Proteinlösungen, die Detergenzien wie beispielsweise Triton X-100 enthalten, bietet sich die spektrophotometrische Proteinbestimmung an. Dabei absorbieren die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin sowie Cystein-Cystein-Disulfidbindungen Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm. Diese Methode

bietet eine schnelle Möglichkeit der ungefähren Bestimmung der Proteinkonzentration, ist jedoch anfällig für bestimmte Pufferzusammensetzungen, wie Salze, Nukleinsäuren oder pH-Wert [45]. Die spektrophotometrische Proteinbestimmung wurde mit dem „NanoDrop™ 2000“ durchgeführt. Von der zu messenden Probe wurden 2 µl auf den Messkopf aufgetragen. Eine Absorptionseinheit entsprach bei der Standardeinstellung einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml .

3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer (1x):

25 mM Tris
190 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein modifiziertes Proteintrennverfahren, welches von Lämmli 1970 entwickelt wurde [46]. Hierbei werden die Proteine in einem diskontinuierlichen Gel durch ein elektrisches Feld auf Grund ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Durch die Bindung des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) an den hydrophoben Aminosäureresten werden die aufzutrennenden Polypeptide negativ geladen. Dabei geht man von einem gleichbleibenden Verhältnis von SDS zum Proteingewicht aus [47]. Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Polypeptid auftrennenden Trenngel mit variierender Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid, sowie einem sich auf dem Trenngel befindenden Sammelgel. Das Sammelgel dient der Aufkonzentrierung der Proben vor der Auftrennung und somit einer besseren Bandenschärfe. Acrylamid und Bisacrylamid polymerisieren nach Radikalisierung durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Katalyse von Tetramethylethyldiamin (TEMED) und bilden je nach Konzentration Poren bestimmter Größe, durch die die Polypeptide wandern können. Das Pipettierschema zur Herstellung der verwendeten Polyacrylamidgele ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

	Trenngel^a		Sammelgel^a
	6 %	12 %	4 %
H₂O_{dd}	2,02 ml	1,02 ml	1,44 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-		250 µl
1 M Tris-HCl, pH 8,8	1,875 ml		-
30 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	1 ml	2 ml	266,6 µl
10 % (w/v) SDS	50 µl		20 µl
10 % (w/v) APS	50 µl		20 µl
TEMED	5 µl		5 µl
Gesamtvolumen	5 ml		2 ml

^a reduzierend

Zunächst wurde der Ansatz für ein Trenngel mit entsprechender Acrylamidkonzentration hergestellt und in eine „XCell SureLock™“ Mini-Kassette gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet um eine ebene Oberfläche des Trenngels zu erreichen. Nach einer halben Stunde Polymerisierung wurde das Isopropanol rückstandslos entfernt und der Ansatz des Sammelgels auf das Trenngel überführt. Anschließend wurde ein Kamm mit entsprechender Anzahl an Zähnen in das Trenngel gesteckt, wodurch nach Polymerisierung die Taschen zur Auftragung der Proben entstehen. Die Gele wurden feucht bei 4 °C gelagert.

Für die SDS-PAGE wurden die Polyacrylamidgele in die „XCell SureLock™“ Elektrophoresekammer eingebaut. Die innere und äußere Kammer wurden mit Laufpuffer gefüllt. Bevor die Proteinproben in die Taschen pipettiert wurden, mussten sie mit einem Probepuffer (1x Roti®-Load, reduzierend) versetzt werden. Anschließend wurden die Proteine für 5 min bei 95 °C denaturiert. Durch Hitzedenaturierung und das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zerstört. Als Proteingrößenmarker wurden jeweils 7 - 10 µl des *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color* (siehe Abbildung 2, Kapitel 3.1.3) aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde für 2 - 3 h im Eiswasserbad bei einer Spannung von 125 V durchgeführt.

3.5.5 Western Blot

Nach der SDS-PAGE können die Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) mittels eines vertikal zum Gel gerichteten elektrischen Spannungsfelds überführt werden. Anschließend können einzelne Proteine mithilfe von Protein-spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Transferpuffer (1x):

- 25 mM Tris
- 190 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS
- 20 % (v/v) Methanol

Der Proteintransfer wurde mit der Nassblot-Methode durchgeführt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel zunächst in eine „XCell II“ *Blotting*-Kammer gelegt. Auf das Gel wurde eine PVDF-Membran gelegt, die zuvor in 100 %-igem Methanol aktiviert wurde. Die Kammer wurde anschließend mit Transferpuffer gefüllt. Die Kammer wurde von der Kathode beginnend bis zur Anode wie folgt aufgebaut:

Aufbau eines Nassblots:

- | | | |
|-------------|-------|---------------------------------------|
| Kathode (-) | 2 - 3 | Schwämme |
| | 2 | <i>Whatman</i> TM -Papiere |
| | 1 | Polyacrylamidgel |
| | 1 | PVDF-Membran |
| | 2 | <i>Whatman</i> TM -Papiere |
| Anode (+) | 2 - 3 | Schwämme |

Der Proteintransfer wurde entweder für 3 h im Eiswasserbad bei einer Spannung von 30 V oder ü. N. bei 4 °C und einer Spannung von 15 V durchgeführt.

Immunodetektion von Proteinen auf einer PVDF-MembranPBS (1x):

10 mM NaH_2PO_4
 130 mM NaCl
 pH 7,0
 autoklavieren

PBS-T:

PBS
 0,2 % (v/v) Tween20

TBS (1x):

20 mM Tris
 137 mM NaCl
 pH 7,6
 autoklavieren

TBS-T:

TBS
 0,1 % (v/v) Tween20

Blocking-Lösung:

PBS-T bzw. TBS-T
 5 % (w/v) BSA

Primärantikörper-Lösung:

Primärantikörper in *Blocking*-Lösung

Sekundärantikörper-Lösung:

Sekundärantikörper
 PBS-T bzw. TBS-T
 5 % (w/v) Milchpulver

Nachdem die Proteine auf die PVDF-Membran transferiert wurden, wurde die Membran entweder für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C in *Blocking*-Lösung geblockt um alle nicht besetzten Bindestellen auf der Membran mit BSA abzusättigen und somit unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit der Primärantikörper-Lösung für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für je 10 min zum Entfernen nichtgebundener Primärantikörper. Danach wurde die Membran mit der Sekundärantikörper-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an der konstanten Region der schweren Kette des Primärantikörpers. Es folgten vier Waschschrte für je 10 min zum Entfernen nichtgebundener Sekundärantikörper. Anschließend wurde die Membran mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection Kit* für 5 min bei RT inkubiert. Durch die an dem Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase wird auf Grund einer Redox-Reaktion Licht emittiert (*enhanced chemiluminescence* - ECL), das auf einem

Chemilumineszenz-Film detektiert werden kann. Der Film wurde zwischen 10 s und 10 min auf die Membran aufgelegt und anschließend in eine Entwicklerlösung überführt, bis eine deutliche Bandenintensität zu erkennen war. Die Entwicklung des Films wurde dann in einer Fixierlösung gestoppt. Die für den Western Blot verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die gewählten Bedingungen sind in Tabelle 4 im Kapitel 3.1.6 angegeben.

3.5.6 Methoden der *in vitro* Proteinsynthese und -translokation

Mithilfe der *in vitro* Proteinsynthese können cDNAs auf Vektorebene zellfrei mittels eines Promotors für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase in mRNA transkribiert und anschließend in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat die Proteine translatiert werden [48,49].

Radioaktive Markierung von Proteinen mittels *in vitro* Transkription und Translation im Retikulozytenlysat und Translokation von Polypeptiden in Membranvesikel

Mithilfe des *TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System* können die Transkription und Translation unmittelbar aufeinanderfolgend in einem Ansatz durchgeführt werden. Die TXNDC16- und GFP-cDNA-Varianten, welche kloniert im pSG5-Vektor vorlagen, wurden mit der T7-Polymerase transkribiert. Die cDNA der „Immunglobulin leichte Kette κ “ (Ig κ) wurde mit der SP6-Polymerase transkribiert. Während der folgenden Translation wird zur radioaktiven Markierung der neu entstehenden Proteine ³⁵S-Methionin in die wachsende Polypeptidkette eingebaut. Um eine Translokation des *in vitro* synthetisierten Polypeptids in Membranvesikel zu untersuchen, werden co-translational Raue Mikrosomen (RM) aus Hundepankreas bzw. sogenannte semipermeabilisierte HeLa-Zellen (SPC) zum Ansatz hinzugegeben. Sowohl die RM als auch die SPC wurden zuvor durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Zimmermann (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, Uniklinikum Homburg/Saar) präpariert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Ansatz einer gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation erfolgte nach folgendem Schema:

Ansatz:

12,5 µl	TnT [®] -Lysat
1 µl	TnT [®] -Puffer
0,5 µl	SP6 bzw. T7 RNA-Polymerase (20 U/µl)
0,5 µl	Aminosäure-Mix (- Met, 1 mM)
0,5 µl	RNasin [®] <i>Ribonuclease Inhibitor</i> (40 U/µl)
1 µl	³⁵ S-Methionin (> 1.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
1 µg	Plasmid
6 % bzw. 32 %	RM bzw. SPC
ad 25 µl	H ₂ O _{dd}

Der Ansatz wurde anschließend für 1 h bei 30 °C inkubiert.

Autoradiographie durch *Phosphorimaging*Entfärber:

40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure
2 % (v/v)	Glycerin

Neutralisierungslösung:

50 % (v/v)	Methanol
1 % (v/v)	Glycerin

Zunächst wurden die Proben der *in vitro* Synthese mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (siehe Kapitel 3.5.4). Anschließend wurde das Gel für 15 min entfärbt und danach für 30 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Das Gel wurde dann für 1 - 2 h bei 90 °C zwischen zwei *Whatman*[™]-Papieren und einer Folie vakuumgetrocknet. Das getrocknete Gel wurde anschließend auf eine Phosphorplatte gelegt und diese für mehrere Stunden bis hin zu einem Tag exponiert. Auf Grund der β-Strahlung der Schwefelisotope von ³⁵S-Methionin, die in die synthetisierten Proteine eingebaut wurden, werden die Moleküle der Phosphorplatte angeregt und mittels des „Typhoon Trio[™]“ Scanners detektiert.

Proteaseresistenztest (Sequestrierung)Proteinase K-Lösung:

162,5 mM Saccharose
 340 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K

Proteinase K/Triton X-100-Lösung:

162,5 mM Saccharose
 340 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K
 0,2 % (w/v) Triton X-100

Saccharose-Lösung:

162,5 mM Saccharose

Um eine Translokation eines synthetisierten Polypeptids in Membranvesikel zu untersuchen, werden diese mit Proteinase K inkubiert. Polypeptide, die nicht in RM translozieren, sind nicht vor Proteinase K geschützt, werden also durch Proteinase K verdaut und sind anschließend mittels *Phosphorimaging* nicht mehr detektierbar. Zur Kontrolle wurden die *in vitro* Synthese-Ansätze zusätzlich mit einer Proteinase K/Triton X-100-Lösung inkubiert. Schützende Kompartimente der RM werden dadurch zerstört wodurch die translozierten Polypeptide ihre Resistenz vor Proteinase K verlieren. Die Saccharose-Lösung dient als Kontrolle, dass nicht zuvor schon eine Proteolyse der *in vitro* synthetisierten Polypeptide erfolgte.

Zur Sequestrierung wurden je 5 μl der o. a. Lösungen zu je 5 μl der Transportansätze gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde anschließend mit je 2 μl einer PMSF-Lösung (100 mM in Ethanol) durch 5 min Inkubation auf Eis gestoppt. Die Auswertung der Sequestrierung erfolgte mittels *Phosphorimaging*.

3.5.7 Markierungsversuche mit Maleimid-PolyethylenglykolHCN-Puffer:

50 mM HEPES
 150 mM NaCl
 2 mM CaCl_2
 pH 7,5
 1 Tablette *cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail* in 10 ml Puffer

Zur genaueren Untersuchung der subzellulären Lokalisation von TXNDC16 in humanen Zellen wurden HeLa-Zellen zunächst mit zwei Plasmiden, die für zwei myc-getaggte Varianten von TXNDC16 kodieren, mittels FuGENE[®] HD transfiziert. Nach

48 h wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mithilfe von Trypsin vom Zellkulturschalenboden abgelöst. Die Zellen wurden danach zweimal mit HCN-Puffer gewaschen und jeweils mit 1.000 x g für 2 min bei RT pelletiert. Die Zellen wurden auf Eis für 20 min mit 0,02 % Digitonin semipermeabilisiert bzw. mit 1 % Triton X-100 solubilisiert. Im Anschluss wurden der Digitonin- sowie der Triton X-100-Ansatz zweigeteilt, wobei die eine Hälfte mit 2 mM Maleimid-Polyethylenglykol-5kDa (malPEG) inkubiert wurde und die andere Hälfte mit 2 mM malPEG sowie 20 mM DTT. Digitonin permeabilisiert ausschließlich die Plasmamembran der Zellen, sodass malPEG nur an zytosolisch lokalisierten Cysteinen binden kann, während bei einer Inkubation mit Triton X-100 auch Cysteine im ER mit malPEG binden. Sobald ein Cystein mit einem malPEG-Molekül bindet, erhöht sich das Molekulargewicht des Proteins um jeweils 5 kDa und es kommt zu einem molekularen Shift, der mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot nachgewiesen werden kann. Durch Zugabe des reduzierenden Moleküls DTT wird die kovalente Bindung des malPEGs an Cysteinen inhibiert. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen nur mit Triton X-100 inkubiert. Nach der Inkubation mittels malPEG erfolgte zum Abstoppen der Reaktion eine letzte Inkubation mit einer finalen Konzentration von 1 % Triton X-100 und 20 mM DTT für 15 min auf Eis. Die proteinhaltigen Überstände wurden anschließend nach Zentrifugation mit 12.000 x g für 10 min bei 4 °C abgenommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von TXNDC16 erfolgte nach dem Western Blot mithilfe eines monoklonalen myc-Antikörpers.

3.6 Serologische Methoden

3.6.1 TXNDC16-Peptidarray

TBS (1x):

50 mM Tris
150 mM NaCl
pH 7,5

TBS-T:

TBS
0,05 % (v/v) Tween20

Blocking-Lösung:

TBS-T
5 % (w/v) Milchpulver

Serum-Lösung:

Serum (1:1.000) in *Blocking*-Lösung

Sekundärantikörper-Lösung:

TBS-T
5 % (w/v) Milchpulver
1:1.000 *Cy5-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Human IgA + IgG + IgM (H + L)*

Zur Bestimmung möglicher immunogener Peptide von TXNDC16 wurde von der Firma Intavis ein Peptidarray hergestellt, auf dem TXNDC16 durch insgesamt 163 Peptide (15mer) in Duplikaten (zwei Subarrays je Array) repräsentiert wird. Die Peptide sind kovalent mit ihrem carboxyterminalen (C-terminalen) Enden an die Zellulosemembran gebunden, ihre aminoterminalen (N-terminalen) Enden mittels Acetylierung geblockt sind und überlappen sich mit je 10 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen sowie die Positionen der Peptide auf dem Array sind in Tabelle 15 im Anhang aufgelistet.

Die Arrays wurden zunächst ü. N. bei 4 °C in *Blocking*-Lösung inkubiert und unspezifische Bindungsstellen durch das Milchpulver abgesättigt. Danach wurden die Arrays mit den entsprechenden Serum-Lösungen ü. N. bei 4 °C inkubiert, sodass die im Serum enthaltenen Autoantikörper an ihren entsprechenden Epitopen binden. Es wurden insgesamt 24 Seren von Meningeompatienten und 19 Seren von gesunden Kontrollprobanden verwendet. Die Angaben zu Alter und Geschlecht der Meningeompatienten und Kontrollen, sowie die histologische Einstufung der Meningeome nach WHO sind in Tabelle 5 (siehe Kapitel 3.1.7) aufgelistet. Anschließend wurden die Arrays dreimal für je 10 min bei RT mit TBS-T gewaschen

und dann mit Sekundärantikörper-Lösung für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei binden die Cy5-gekoppelten Antikörper aus Kaninchen an den peptidbindenden Immunglobulinen aus dem humanen Serum. Anschließend wurden die Arrays zweimal für je 10 min bei RT mit TBS-T und danach weitere zweimal für je 10 min mit TBS gewaschen. Die Arrays wurden in mehreren Durchgängen inkubiert. Während eines jeden Durchgangs wurde jeweils ein Array nur mit Sekundärantikörper inkubiert. Die genauen Serum- und Sekundärantikörper-Konzentrationen aller durchgeführten Arrays sind der Tabelle 16 im Anhang zu entnehmen. Die Detektion der gebundenen Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte mittels des Arrayscanners „ScanArray Lite“ bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Die Intensitätswerte aller Peptide wurden mit der Software „ScanArray Express“ bestimmt. Die Verstärkung des *Photomultiplier Tubes* (PMT) wurde auf 40 % gesetzt und eine Auflösung von 20 µm (Microns) gewählt.

3.6.2 Bioinformatische Auswertung der Peptidarrays

Um spezifische Epitope von TXNDC16 anhand von Autoantikörpern im Serum von Meningeompatienten zu identifizieren, wurden die Intensitätswerte der Peptide aller Arrays mittels bioinformatischer Methoden ausgewertet. Die Auswertung wurde von Frau B. Sc. Valentina Galata im Rahmen eines Praktikums am Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes durchgeführt, unter Verwendung von „R“, einer Programmiersprache und Software-Umgebung für statistische Analysen und Grafiken [50].

Quantil-Normalisierung

Bei jedem Array wurden für die vom Arrayscanner „ScanArray Lite“ ermittelten Intensitätswerte der jeweilige Mittelwert des Vordergrunds (*mean foreground*) und des Hintergrunds (*mean background*) eines Peptids genommen und der binäre Logarithmus derer Quotienten gebildet.

$$\log_2 \left(\frac{\text{mean foreground}}{\text{mean background}} \right)$$

Auf Grund unterschiedlicher Serien sind die Intensitäten der Peptide aller Arrays unterschiedlich hoch. Zur Normalisierung der Werte wurde das R-Package „limma“ sowie die Methode „normalizeQuantiles“ angewendet.

Jeder Array besteht aus zwei identischen Subarrays. Es wurde zunächst von jedem Peptidwert eines Subarrays eine Quantil-Normalisierung durchgeführt und anschließend der Mittelwert der beiden normalisierten Werte eines Peptids gebildet. Die Auswertung erfolgte nicht nur für die mit Serum inkubierten Arrays sondern auch für die Kontrollarrays, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurden (Negativkontrollen).

Prozessierung der Negativkontrollen

Anschließend wurden Ausreißer bestimmter Peptidintensitätswerte innerhalb eines Arrays, der nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurde, eliminiert. Unter Ausreißer versteht man die Datenpunkte, die außerhalb der Antennen (Whisker) eines Box-Whisker-Plots liegen. Die Antennen sind definiert durch:

$$Q_1 - 1,5 \cdot IQR \quad \text{bzw.} \quad Q_3 + 1,5 \cdot IQR$$

wobei: Q_1 = unteres Quartil
 Q_3 = oberes Quartil
 $IQR = Q_3 - Q_1$

Der IQR gibt den Bereich an, in dem sich die mittleren 50 % der Werte eines Datensatzes befinden. Somit wurden alle Werte als Ausreißer betrachtet für die gilt:

$$x < Q_1 - 1,5 \cdot IQR \quad \text{bzw.} \quad x > Q_3 + 1,5 \cdot IQR$$

Die Werte der Ausreißer wurden anschließend durch die Mittelwerte der jeweiligen Peptidintensitätswerte aller Negativkontrollen (exklusive der Ausreißer) ersetzt.

Zum Schluss wurden von den Quantil-normalisierten Peptidintensitätswerten die Intensitätswerte der tagesgleichen Negativkontrollen subtrahiert.

Prozessierung der Daten mittels Thresholds

Eine weitere Möglichkeit der Normalisierung bietet die Bestimmung eines oder mehrerer Thresholds innerhalb eines Arraydatensatzes zur Klassifizierung der Peptidintensitäten. Zur Vermeidung von Intensitätsunterschieden zwischen mehreren Arrays wurde von einer gleichmäßigen Verteilung seroreaktiver Epitope innerhalb eines Arrays ausgegangen. Dabei wurden die 5 %-intensitätsstärksten Epitope als seropositiv (Wert = 2), die 20 %-intensitätsstärksten Epitope als schwach-seropositiv (Wert = 1) und alle restlichen Epitope als seronegativ (Wert = 0) klassifiziert.

Klassifizierung mittels *Feature Selection*

Zur Berechnung immunogener Epitope von TXNDC16, die bevorzugt von Autoantikörpern entweder in der Gruppe der Seren von Meningeompatienten oder von normalen Kontrollprobanden auftreten, wurde eine Support-Vektor-Maschine mit linearem Kernel verwendet. Dabei wird ein Set von Epitopen berechnet (*Feature Selection*), wobei man anhand der Seroreaktivitätsmuster die Gruppe der Meningeompatienten mit möglichst hoher Spezifität (Richtignegativrate), Sensitivität (Richtigpositivrate) und Genauigkeit von der Kontrollgruppe trennen kann. Dieses Klassifizierungsmuster wird anschließend zur Bestimmung seiner Qualität einer 20-fachen Kreuzvalidierung unterzogen. Der Datensatz wird in gleich große Folds unterteilt: Jeder Fold wird einmal als Testset benutzt und die restlichen Folds als Trainingssets. Das Klassifizierungsmuster wird nun auf den Trainingssets aufgebaut und mithilfe des Testsets qualitativ ausgewertet. Für jeden Fold werden die Spezifität, Sensitivität und die Genauigkeit berechnet. Zur Bestätigung, dass diese Ergebnisse nicht zufällig gewonnen wurden, wird im Anschluss eine zufällige Permutation der Gruppen vorgenommen mit erneuter Kreuzvalidierung.

4 Ergebnisse

4.1 Zytosolische Assoziation von TXNDC16 mit dem Endoplasmatischen Retikulum

Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von TXNDC16 durch Immunfluoreszenzaufnahmen mittels Konfokalmikroskopie. Die Ergebnisse sollten anschließend sowohl mittels Western Blot von HEK293-Zellen als auch durch FACS-Analyse von HeLa-Zellen nach Semipermeabilisierung validiert werden. Da TXNDC16 laut bioinformatischen Vorhersageprogrammen über ein aminoterminal (N-terminal) Signalpeptid verfügen soll, wurde eine Deletionsmutante von TXNDC16 ohne dieses Signalpeptid sowie ein Fusionsprotein des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) mit dem TXNDC16-Signalpeptid hergestellt und licht- bzw. konfokalmikroskopisch ausgewertet. Mithilfe des GFP-Fusionsproteins wurde in einem *in vitro* Transkriptions- und Translationsversuch unter Verwendung von Mikrovesikeln eine mögliche Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids untersucht. Da für TXNDC16 ein sekretorisches Verhalten vorhergesagt wurde, sollte das Protein in Zellkulturüberständen humaner Zelllinien nachgewiesen werden. Ein mögliche fehlende Funktionalität des carboxyterminal (C-terminal) maskierten Retentionssignals DKEL sollte dabei sowohl bei TXNDC16- als auch GFP-Varianten getestet werden. Abschließend sollte geklärt werden, ob TXNDC16 nach Sezernierung durch HEK293-Zellen exosomal oder gelöst im Überstand lokalisiert war.

4.1.1 Immunfluoreszenz von TXNDC16-HA in HeLa-Zellen

Um die zelluläre Lokalisation von TXNDC16 zu bestimmen, wurde die Zervixkarzinomzelllinie HeLa mit dem Plasmid pSG5-TXNDC16-HA transfiziert. Die cDNA kodiert für eine mit Hämagglutinin (HA) am C-Terminus getaggte Variante von TXNDC16. TXNDC16-HA wurde in den HeLa-Zellen über einen SV40-Promotor transient exprimiert und nach Fixierung der Zellen durch Paraformaldehyd mit einem monoklonalen HA-spezifischen Antikörper mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der HeLa-Zellen zeigen eine Co-Lokalisation von TXNDC16 mit Proteindisulfidisomerase (PDI), einem luminalen Protein des

Endoplasmatischen Retikulums (ER) (siehe Abbildung 4). Dies deutet auf eine Lokalisation von TXNDC16 im ER hin, wobei mit dieser Methode nicht eindeutig geklärt werden kann, ob es sich um eine ER-luminale, ER-membranständige oder ER-membranassoziierte Lokalisation auf luminaler oder zytosolischer Seite handelt.

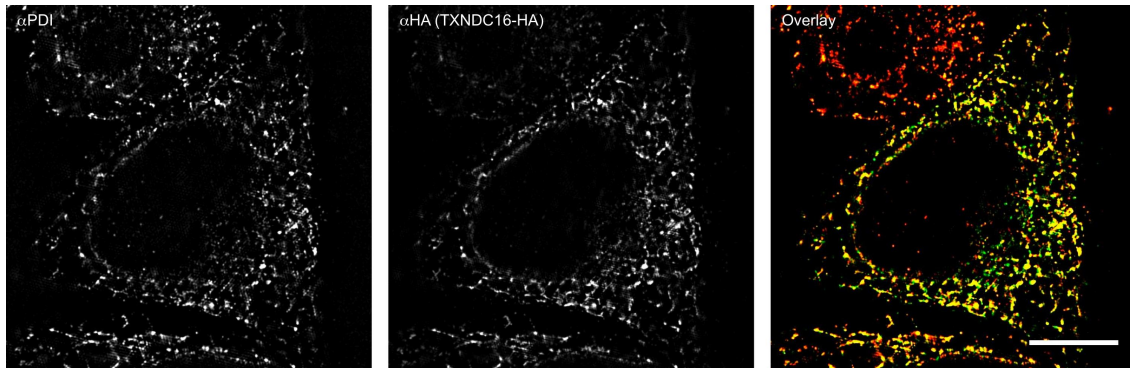


Abbildung 4: Zelluläre Lokalisation von TXNDC16-HA in HeLa-Zellen mittels Konfokalmikroskopie (SIM) unter der Verwendung eines HA-spezifischen monoklonalen Antikörpers. Zur Färbung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die ER-luminale Proteindisulfidomerase (PDI) verwendet. In der Überlagerung (Overlay) ist die subzelluläre Lokalisation von TXNDC16 im ER zu erkennen. Messbalken entspricht 5 μm .

4.1.2 Keine Proteinase K-Resistenz von TXNDC16-HA

Zur Aufklärung einer möglichen ER-luminalen Lokalisation von TXNDC16 wurde eine sogenannte Sequestrierung durchgeführt. Die Sequestrierung ermöglicht die Untersuchung eines *in vitro* translatierten Polypeptids auf Translokation in ein geschütztes Kompartiment (Raue Mikrosomen, RM). Translozierte luminal sowie membranständige Substrate besitzen durch die sie umgebende Membran eine Resistenz gegen einen Verdau mit Proteinase K. Mittels Triton X-100 können diese Doppellipid-Strukturen aufgebrochen und die Substrate zugänglich für Proteinase K gemacht werden.

Zunächst wurde eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation des Plasmids pSG5-TXNDC16-HA durchgeführt. Dabei stellt die T7-Polymerase ein Transkript der cDNA her, welches durch das Kaninchen-Retikulozytenlysat, unter Verwendung radioaktivmarkierter Aminosäuren, translatiert wird. In Anwesenheit des Signalpeptids wird das Polypeptid ab dem Synthesebeginn in die RM transloziert. Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine anschließend der Größe nach aufgetrennt und auf Grund ihrer radioaktiven Markierung mittels *Phosphorimaging* detektiert. Als Kontrolle wurde der

Versuch mit dem Plasmid pCI-neo-KSCI (AG Prof. Dr. R. Zimmermann, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, Uniklinikum Homburg/Saar), welches die cDNA-Sequenz für die „Immunglobulin leichte Kette κ “ trägt, ebenso durchgeführt und die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt.

Abbildung 5 zeigt, dass TXNDC16-HA sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von schützenden Mikrovesikeln nicht nachweisbar war, somit keine Proteinase K-Resistenz besitzt, und folglich nicht in die RM transloziert wurde. Im Gegensatz zu TXNDC16-HA erkennt man in der Kontrolle der „Immunglobulin leichte Kette κ “, dass lediglich das Vorläufersubstrat sowohl in An- als auch Abwesenheit von RM abgebaut wurde, während die kleinere, prozessierte Form durch die RM geschützt und nicht durch Proteinase K verdaut wurde.

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine ER-luminale Lokalisation von TXNDC16 sowie gegen eine Lokalisation integral in der ER-Membran, sondern deuten auf eine ER-membranassoziierte Lokalisation auf zytosolischer Seite hin.

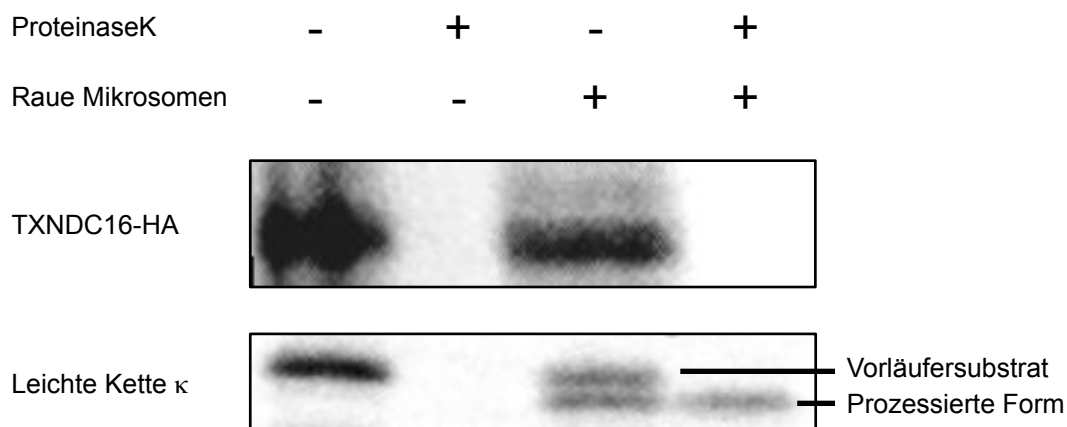


Abbildung 5: Phosphorimaging des Sequestrierungsversuchs von TXNDC16 in Mikrovesikel. TXNDC16-HA ist nach gekoppelter *in vitro* Transkription und Translation in Anwesenheit von Rauhen Mikrosomen (RM) nicht vor dem Proteinase K-Verdau geschützt und wird somit nicht in die RM eingebaut. Die „Immunglobulin leichte Kette κ “ liegt sowohl als Vorläufersubstrat als auch prozessiert in Anwesenheit der RM vor. Nach Proteinase K-Verdau ist das Vorläufersubstrat abgebaut und die in den RM translozierte prozessierte Form vor dem Verdau geschützt.

4.1.3 Molekularer Shift von myc-TXNDC16-DKEL

Zur Bestätigung der Vermutung, dass es sich bei TXNDC16 um ein ER-membranassoziiertes Protein auf zytosolischer Seite der ER-Membran handelt, wurde ein Shift-Versuch mit Maleimid-Polyethylenglykol (malPEG) durchgeführt.

Hierbei wurden HeLa-Zellen mit dem Plasmid pSG5-myc-TXNDC16-DKEL transfiziert, wodurch eine TXNDC16-Variante transient exprimiert wurde, die am N-Terminus auch nach putativer Abspaltung des Signalpeptids ein myc-Tag trug und deren letzten sechs Aminosäuren deletiert waren, sodass am C-terminalen Ende die ER-Retentionssequenz DKEL exponiert war. Dadurch blieb diese Protein-Variante in der Zelle und wurde nicht sezerniert. Diese TXNDC16-Variante wurde anstatt der C-terminal unveränderten Variante gewählt, da in folgenden Experimenten gezeigt werden konnte, dass das wildtypische TXNDC16 auf Grund seiner Sezernierung in den Zellkulturüberstand zur genaueren Detektion in zu geringer Menge in der Zelle vorkommt (siehe Kapitel 4.1.7). Die Zellen wurden anschließend selektiv mit den Detergenzien Digitonin und Triton X-100 permeabilisiert und mit malPEG inkubiert. Digitonin permeabilisiert nur die Plasmamembran während Triton X-100 sämtliche Membranen, einschließlich der Membran des ERs, permeabilisiert. MalPEG bindet kovalent an frei zugängliche Cysteine, wodurch es in der SDS-PAGE zu einem molekularen Shift von 5 kDa pro gebundenem malPEG kommt. Zur Kontrolle wird die Reaktion mit DTT blockiert, so dass ein Shift ausbleibt.

In Abbildung 6A ist zu erkennen, dass nach Immunodetektion mit einem polyklonalen myc-Antikörper myc-TXNDC16-DKEL sowohl bei Permeabilisierung der HeLa-Zellen mit Digitonin als auch mit Triton X-100 ein höheres Molekulargewicht besitzt und somit TXNDC16 zytosolische Cysteine exponiert. Zum Vergleich wurden Immunodetektionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das zytosolische Protein β -Actin als auch mit einem polyklonalen Antikörper gegen das ER-luminale Protein PDI durchgeführt. Für das zytosolische Protein β -Actin ist zu erkennen, dass es sowohl bei Permeabilisierung mit Digitonin als auch mit Triton X-100 zu einem Shift im molekularen Gewicht kommt, während bei dem ER-luminalen Protein PDI der Shift nur bei Permeabilisierung mit Triton X-100 zu erkennen ist.

Zur Kontrolle wurden die HeLa-Zellen mit dem Plasmid pSG5- Δ SP-myc-TXNDC16 transfiziert. Hierbei wurde eine N-terminal myc-getaggte zytosolische Variante von TXNDC16 transient exprimiert, bei der das N-terminale Signalpeptid fehlt. In Abbildung 6B ist zu erkennen, dass malPEG sowohl nach Permeabilisierung mit Digitonin als auch mit Triton X-100 ebenso an Cysteine von Δ SP-myc-TXNDC16 kovalent bindet wie bei der Variante myc-TXNDC16-DKEL (siehe Abbildung 6A). Da der Größen-Shift bei der zytosolischen Variante Δ SP-myc-TXNDC16 augenscheinlich genauso groß ist, wie der Größen-Shift bei myc-TXNDC16-DKEL, kann hier eine Bindung der gleichen Anzahl von malPEGs vermutet werden. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine ER-membranassoziierte Lokalisation von TXNDC16 auf zytosolischer Seite.

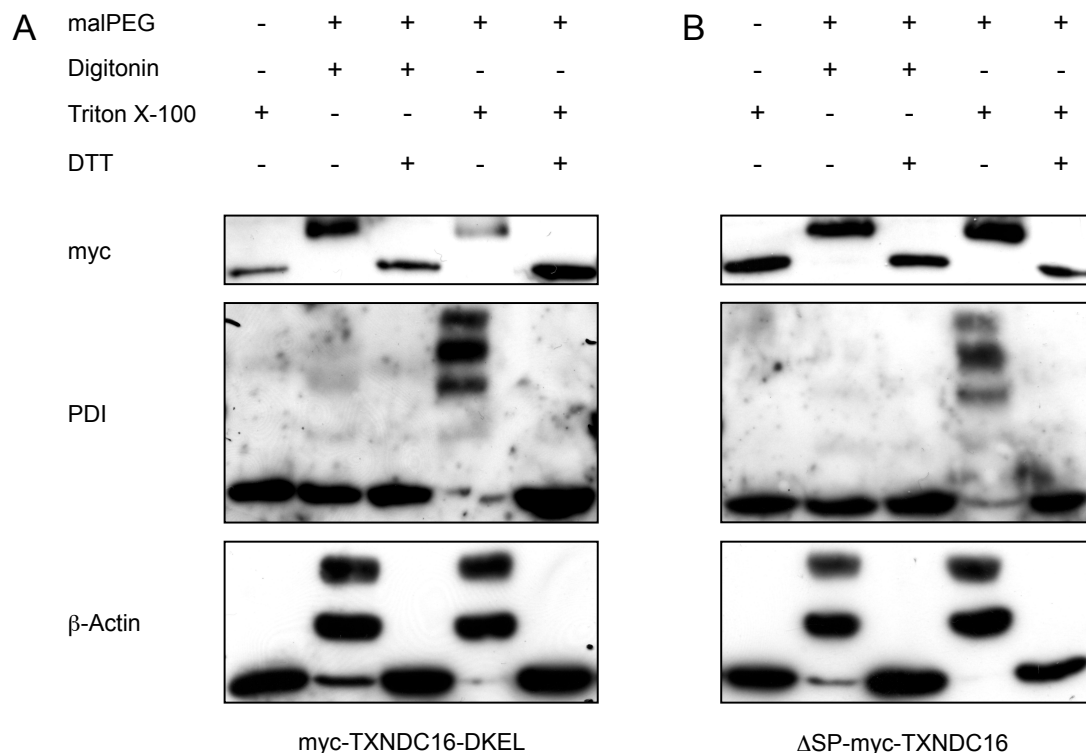


Abbildung 6: Molekularer Shift von TXNDC16 nach Inkubation mit Maleimid-Polyethylenglykol (malPEG). Nach selektiver Permeabilisierung von HeLa-Zellen mittels Digitonin kann malPEG an Cysteinen von zytosolischen Proteinen binden, nicht aber von Proteinen des ERs. Sowohl myc-TXNDC16-DKEL (A), die zytosolische Variante Δ SP-myc-TXNDC16 (B) sowie das zytosolische Protein β -Actin zeigen im Western Blot ein höheres Molekulargewicht nach Permeabilisierung mit Digitonin und Inkubation mit malPEG, während bei PDI hingegen der Größen-Shift ausbleibt.

4.1.4 Bestimmung der zytosolischen Lokalisation mittels FACS

Da der malPEG-Shift-Assay mit veränderten TXNDC16-Varianten durchgeführt wurde, können die Ergebnisse nur bedingt auf das wildtypische TXNDC16 übertragen werden. Die möglichen Veränderungen in der Sekundärstruktur von TXNDC16 durch die Veränderung des N- und C-Terminus könnten hier die Ergebnisse beeinflussen. Im Weiteren könnte die Überexpression von TXNDC16 in den HeLa-Zellen eine artifizielle Lokalisation von TXNDC16 in diesen Zellen hervorrufen. Zum Ausschluss dieser beiden Punkte wurde die Lokalisation von wildtypischem, endogenem TXNDC16 in HeLa-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden die Zellen zum einen mit Digitonin, zum anderen mit Triton X-100 permeabilisiert. Als Kontrolle wurden unpermeabilisierte HeLa-Zellen untersucht. Als zytosolischer Marker wurde das Strukturprotein α -Tubulin und als ER-Marker das ER-luminale Protein PDI mittels spezifischer Antikörper gefärbt. Für TXNDC16 wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von TXNDC16 verwendet.

Die FACS-Analyse zeigte, dass eine Bindung des TXNDC16-spezifischen Antikörpers in 86 % der 2.000 untersuchten Zellen bereits nach Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin erfolgte, während der PDI-spezifische Antikörper nur in 8,2 % der untersuchten Zellen ein Signal zeigte. Erst nach Permeabilisierung der ER-Membran mit Triton X-100 konnte eine Bindung des PDI-Antikörpers in 46 % der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7). Erwartungsgemäß konnte die Bindung des Antikörpers gegen das zytosolische Protein α -Tubulin sowohl nach Permeabilisierung der Plasmamembran als auch nach Permeabilisierung der ER-Membran in 80 % bzw. 82 % der Zellen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass es sich bei TXNDC16 um ein zytosolisches, ER-assoziiertes Protein handelt.

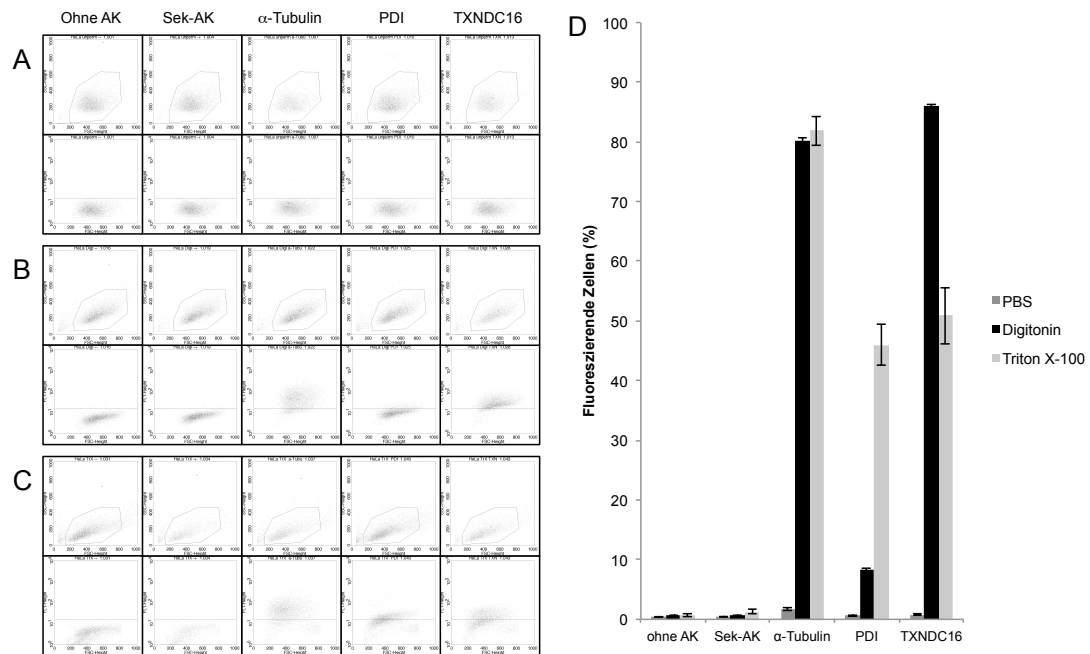


Abbildung 7: FACS-Analyse zur zellulären Lokalisation von TXNDC16 in HeLa-Zellen. (A-C) Repräsentative FACS-Profil: (A) ohne Permeabilisierung, (B) nach Permeabilisierung mit Digitonin und (C) nach Permeabilisierung mit Triton X-100. (D) Quantitative Auswertung der mittels FACS analysierten fluoreszierenden HeLa-Zellen. Während der Antikörper für den ER-Marker erst nach Permeabilisierung mit Triton X-100 bindet, erfolgt die Bindung des TXNDC16-spezifischen Antikörpers bereits nach Permeabilisierung mit Digitonin. TXNDC16 ist somit ein ER-assoziiertes zytosolisches Protein.

4.1.5 Funktionalität und Abspaltung des Signalpeptids von TXNDC16

Die ersten 27 Aminosäuren am N-Terminus von TXNDC16 werden von dem Vorhersageprogramm „SignalP“ als Signalpeptid erkannt. Zum Nachweis der Funktionalität dieses putativen Signalpeptids für die Lokalisation von TXNDC16 am ER wurde ein Plasmid mit einer Deletionsvariante von TXNDC16 hergestellt (pSG5-ΔSP-TXNDC16-HA), bei der N-terminal das putative Signalpeptid fehlt und C-terminal ein HA-Tag zur Detektion von TXNDC16 in der Immunfluoreszenz angefügt wurde. Das Plasmid mit der Deletionsvariante wurde in HeLa-Zellen transient exprimiert und die Zellen anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen die ER-luminale Proteindisulfidisomerase (PDI) und gegen das HA-Tag gefärbt (siehe Abbildung 5, Kapitel 4.1.2). Während das wildtypische TXNDC16 im Overlay eine Co-Lokalisation mit PDI im ER zeigt (siehe Abbildung 4, Kapitel 4.1.1), weist die Deletionsvariante keine Co-Lokalisation mehr auf, sondern eine zytosolische Lokalisation (siehe Abbildung 8A). Das Ergebnis spricht also für eine Funktionalität des Signalpeptids.

Zur Bestätigung der Funktionalität wurde ein weiteres Plasmid hergestellt, welches die cDNA-Sequenz des TXNDC16-Signalpeptids im 5'-Bereich der cDNA des grünfluoreszierenden Proteins GFP (pSG5-SP-TXNDC16-GFP) enthält. Das hergestellte Plasmid sowie ein Kontroll-Plasmid mit wildtypischem GFP wurden ebenfalls in HeLa-Zellen transient exprimiert und die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen PDI untersucht. Während die wildtypische GFP-Variante ubiquitär in der Zelle verteilt ist (siehe Abbildung 8B), zeigt die GFP-Variante mit dem TXNDC16-Signalpeptid eine Lokalisation im Bereich des ERs (siehe Abbildung 8C). Im Overlay erkennt man neben der ER- auch eine Golgi-Lokalisation von SP-TXNDC16-GFP (Pfeil), was auf ein mögliches sekretorisches Verhalten dieses Proteins hindeuten kann.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die 27 Aminosäuren am N-Terminus von TXNDC16 ein funktionelles Signalpeptid für die ER-assoziierte Lokalisation von TXNDC16 darstellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass GFP, welches bei rekombinanter Expression in HeLa-Zellen ubiquitär lokalisiert ist, durch Anfügen dieses

27 Aminosäuren großen Signalpeptides den sekretorischen Weg über das ER und den Golgi-Apparat durchläuft.

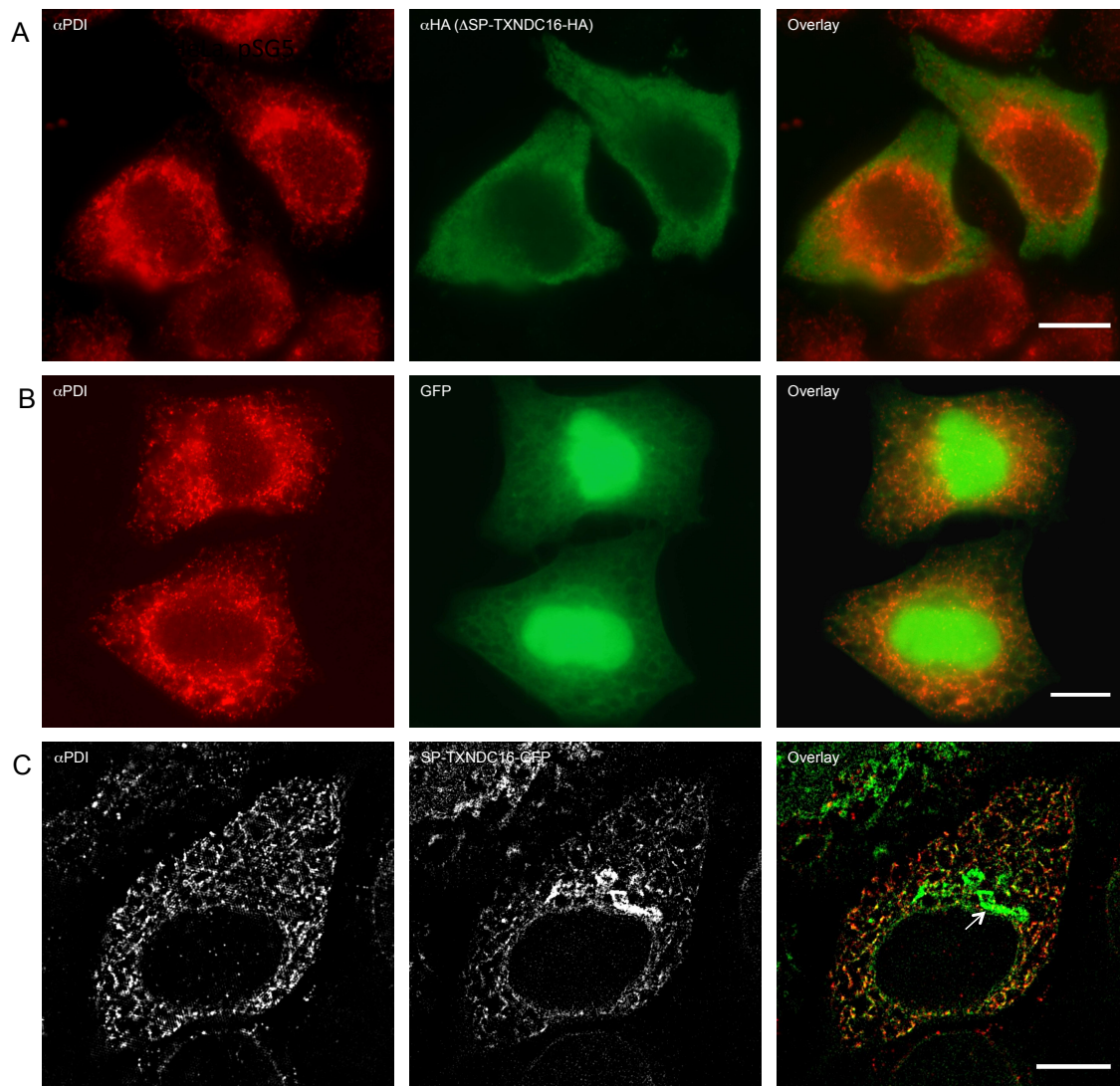


Abbildung 8: Lokalisation der Deletionsvariante Δ SP-TXNDC16-HA, von GFP und der GFP-Variante SP-TXNDC16-GFP in HeLa-Zellen. Δ SP-TXNDC16-HA wurde mittels HA-spezifischem Antikörper nachgewiesen. Zur Markierung des ERs wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die ER-luminale Proteindisulfidomerase (PDI) verwendet. (A) Die Deletionsvariante Δ SP-TXNDC16-HA ist ohne Signalpeptid zytosolisch lokalisiert. (B) Ubiquitäre Lokalisation von GFP. (C) ER-assoziierte und Golgi-Lokalisation (Pfeil) der GFP-Variante SP-TXNDC16-GFP. (A) & (B) Fluoreszenzmikroskopie. Vergrößerung: 100x (Olympus-Objektiv). (C) Konfokalmikroskopie (SIM). Vergrößerung: 100x. Messbalken entspricht 5 μ m.

N-terminale Signalpeptide für das ER werden in der Regel co-translational nach Bindung an das *signal recognition particle* (SRP) durch eine Signalpeptidase abgespalten [51]. Die Abspaltung eines Signalpeptids lässt sich mit einer gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation mit Retikulozytenlysat in Gegenwart von radioaktiv markierten Aminosäuren und RM aus Hundepankreas bzw. semi-

permeabilisierten Zellen (*semi permeable cells* - SPC) nachweisen. In Anwesenheit des Signalpeptids wird das Polypeptid in die RM bzw. die Mikrovesikel der SPC mit beginnender Synthese transloziert. Mittels SDS-Page können die Proteine anschließend der Größe nach aufgetrennt und auf Grund ihrer radioaktiven Markierung mittels *Phosphorimaging* detektiert werden.

Auf Grund des geringen Größenunterschieds von TXNDC16 mit Signalpeptid (93 kDa) und ohne Signalpeptid (90 kDa), ist diese Abspaltung in der SDS-PAGE nicht sicher nachweisbar. Daher wurde für den Nachweis der Abspaltung des Signalpeptids eine GFP-Variante mit N-terminalem TXNDC16-Signalpeptid (SP-TXNDC16-GFP) verwendet sowie als Kontrolle wildtypisches GFP ohne Signalpeptid. Da Letzteres ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa, die GFP-Variante mit Signalpeptid dagegen ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa besitzt, ist eine Unterscheidung der beiden Größen in einer SDS-PAGE möglich.

Bei der GFP-Variante mit TXNDC16-Signalpeptid (SP-TXNDC16-GFP) sind sowohl in Gegenwart von RM als auch in Gegenwart von SPC je zwei Banden zu erkennen (siehe Abbildung 9). Die obere Bande bei ca. 30 kDa entspricht dem sogenannten Precursor, dem unprozessierten Polypeptid. Bei der unteren 27 kDa großen Bande handelt es sich um die prozessierte Form von SP-TXNDC16-GFP, d. h. nach Abspaltung des ca. 3 kDa großen Signalpeptids. Bei der Kontrolle ohne RM und SPC (Mikrosomen verdünnender Puffer - MVP) fehlt dagegen die Bande der prozessierten Form.

Bei der wildtypischen GFP-Variante ist sowohl in den Reaktionsansätzen mit RM und SPC als auch bei der Kontrolle mit MVP jeweils nur eine Bande bei 27 kDa zu erkennen, dem eigentlichen Molekulargewicht von GFP. Da wildtypisches GFP kein Signalpeptid für die Translokation ins ER besitzt wird das synthetisierte Polypeptid nicht weiter prozessiert. Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass das Signalpeptid von TXNDC16 während der Prozessierung ins ER abgespalten wird.

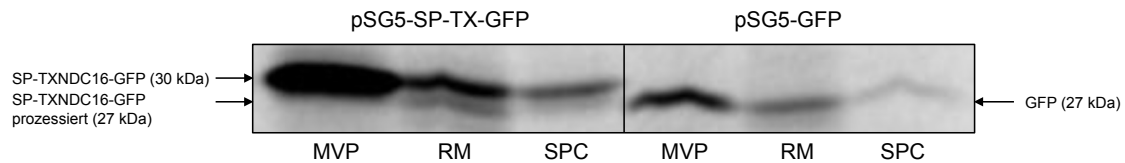


Abbildung 9: Co-translationale Translokation von GFP und SP-TXNDC16-GFP in Raue Mikrosomen (RM) bzw. semipermeabilisierte Zellen (*semi permeable cells* - SPC) mittels gekoppelter *in vitro* Transkription und Translation. Auftrennung der ^{35}S -Methionin markierten Polypeptide mittels SDS-PAGE und Detektion mittels *Phosphorimaging*. Precursor (ca. 30 kDa) von SP-TXNDC16-GFP bei RM, SPC und bei der Kontrolle mit Mikrosomen verdünnendem Puffer (MVP). Die prozessierte Form von SP-TXNDC16-GFP hat dasselbe Molekulargewicht wie GFP (ca. 27 kDa) und deutet auf eine Abspaltung des Signalpeptids nach Translokation hin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die 27 Aminosäuren am N-Terminus von TXNDC16 ein funktionelles Signalpeptid für die ER-assoziierte Lokalisation von TXNDC16 darstellen und dieses Signalpeptid während der Prozessierung abgespalten wird.

4.1.6 Sezernierung von TXNDC16 in das Zellkulturmedium

Obwohl die bisherigen Daten auf eine subzelluläre Lokalisation von TXNDC16 auf der zytosolischen Seite des ERs hinweisen, scheint das Signalpeptid von TXNDC16, wie im Kapitel 4.1.5 gezeigt, zu einer Sezernierung des Fusionsproteins SP-TXNDC16-GFP zu führen. Zur Überprüfung einer eventuellen Sezernierung von endogenem TXNDC16 wurden daher die Proteine aus Zellkulturüberständen etablierter Meningeomzelllinien (Ben-Men-1, HBL-52, IOMM-Lee), sowie der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der Humanen Embryonalen Nierenzelllinie HEK293 gefällt und anschließend TXNDC16 mittels spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert.

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass TXNDC16 bei allen untersuchten Zelllinien im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte. Dabei variiert die Menge an TXNDC16 zwischen den Zelllinien. Bei HeLa ist die geringste Menge an TXNDC16 detektiert worden, während bei HEK293 und der benignen Meningeomzelllinie HBL-52 die größte Menge festzustellen war.

Es wurde ebenso die Expression von TXNDC16 im Proteinlysate der Zellen untersucht. Dabei ist interessant, dass TXNDC16 bei allen untersuchten Meningeomzelllinien nicht im Proteinlysate detektierbar war, wohl aber in HEK293 und HeLa.

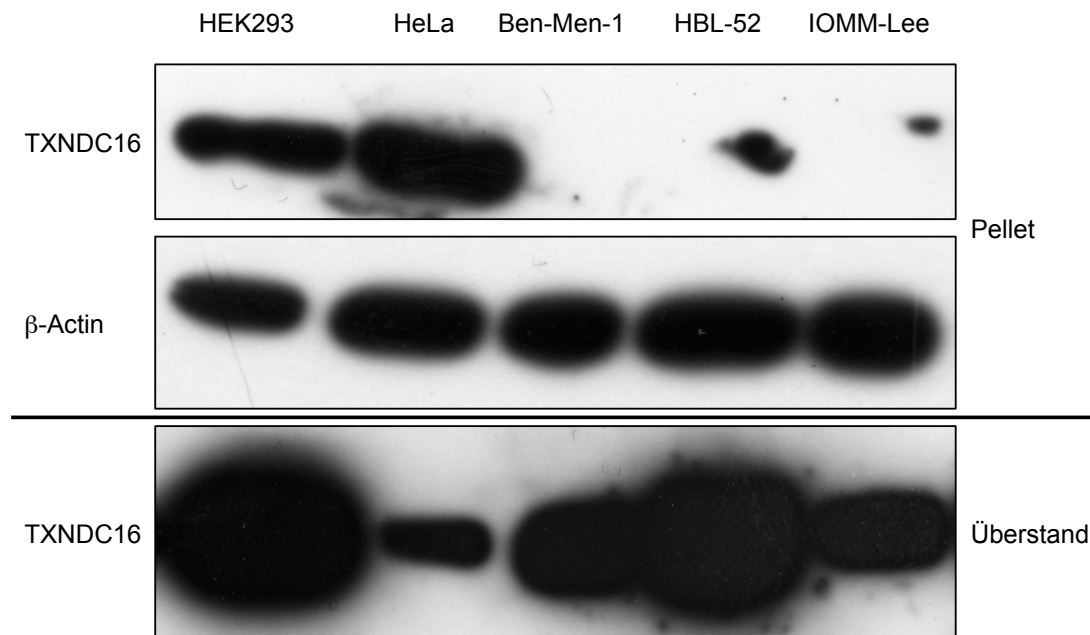


Abbildung 10: Sezernierungsverhalten von TXNDC16 in humanen Zelllinien. Es wurde die Humane Embryonale Nierenzelllinie HEK293, die Zervixkarzinomzelllinie HeLa, die benignen Meningeomzelllinien Ben-Men-1 und HBL-52 sowie die maligne Meningeomzelllinie IOMM-Lee verwendet. TXNDC16 ist nur bei HEK293 und HeLa im Proteinlysate nachweisbar, jedoch nicht bei den Meningeomzelllinien. TXNDC16 wird von allen untersuchten Zelllinien sezerniert.

4.1.7 Keine Funktionalität des maskierten ER-Retentionssignals von TXNDC16

Die cDNA-Sequenz von TXNDC16 besteht am 3'-Ende aus zehn Codons, die sowohl für eine Peptidsequenz eines ER-Retentionssignals kodieren als auch für sechs weitere Aminosäuren. Das exprimierte Retentionssignal DKEL ist somit nicht direkt am C-Terminus des TXNDC16-Proteins lokalisiert, sondern durch die sechs weiteren Aminosäuren GCSVKN „maskiert“ [52]. Da TXNDC16 im Zellkulturmedium einiger Zelllinien nachweisbar war, stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um einen artifiziellen Nachweis des Proteins handelt oder das Protein tatsächlich den natürlichen sekretorischen Weg durchläuft.

Um diese Frage zu beantworten wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Plasmid-Konstrukten von TXNDC16 transfiziert (siehe Abbildung 11A). Alle drei Konstrukte tragen am N-Terminus ein myc-Tag zur Detektion von TXNDC16, welches nicht mit dem Signalpeptid abgespalten wird. Das erste Konstrukt kodiert für eine Variante von TXNDC16 mit Signalpeptid und wildtypischen C-Terminus (pSG5-myc-TXNDC16), das zweite Konstrukt exprimiert eine TXNDC16-Variante ohne

Signalpeptid mit wildtypischen C-Terminus (pSG5- Δ SP-myc-TXNDC16) und das dritte Konstrukt kodiert für eine TXNDC16-Variante mit Signalpeptid, aber mit einem veränderten C-Terminus, bei dem die letzten sechs Codons deletiert wurden, womit die ER-Retentionssequenz DKEL direkt am C-Terminus lokalisiert ist (pSG5-myc-TXNDC16-DKEL).

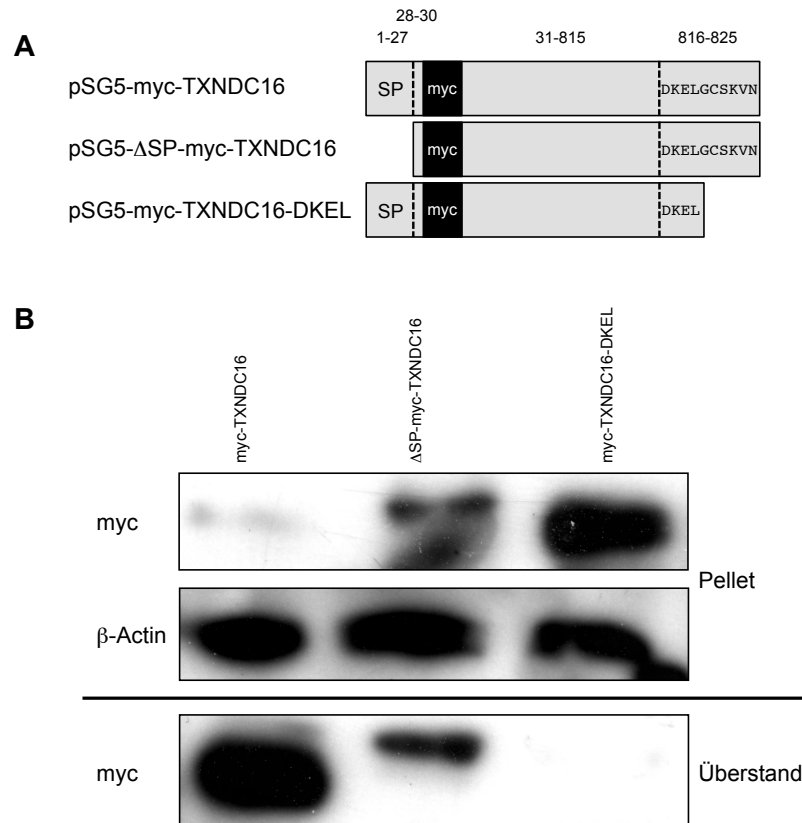


Abbildung 11: Sezernierung von myc-TXNDC16 in Abhängigkeit des Carboxyterminus. (A) Schematische Darstellung der drei exprimierten Proteinvarianten von TXNDC16 nach Transfektion von HEK293-Zellen mit den jeweiligen Plasmidkonstrukten. Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf das wildtypische TXNDC16. SP = TXNDC16-Signalpeptid. (B) Immunodetektion der TXNDC16-Varianten im Zellpellet von HEK293-Zellen sowie nach TCA/Aceton-Fällung im Zellkulturüberstand. Die Detektion der TXNDC16-Varianten erfolgte mittels polyklonalem α -myc-Antikörper. myc-TXNDC16 ist am stärksten im Überstand und kaum im Pellet nachweisbar. Die Deletionsvariante mit C-terminalem ER-Retentionssignal myc-TXNDC16-DKEL ist im Überstand nicht nachweisbar, jedoch verstärkt im Zellpellet. Die zytosolische Variante Δ SP-myc-TXNDC16 ist moderat im Pellet und im Überstand detektierbar. Das Strukturprotein β -Actin dient als Ladungskontrolle.

In Abbildung 11B ist die Expression der unterschiedlichen TXNDC16-Varianten mittels Western Blot und Immunodetektion mit dem polyklonalen Antikörper gegen das myc-Tag dargestellt. TXNDC16 mit Signalpeptid und wildtypischem C-Terminus ist im Zellpellet kaum nachweisbar, allerdings ist eine starke Bande im Zellkulturüberstand zu sehen. Die Variante mit Signalpeptid und C-terminalem DKEL ohne die sechs folgenden Aminosäuren hingegen ist im Zellpellet stark exprimiert, während das

Protein im Überstand nicht nachweisbar ist. Bei TXNDC16 ohne Signalpeptid wird eine zytosolische Lokalisation und somit eine Expression im Zellpellet erwartet. Obwohl pSG5-ΔSP-myc-TXNDC16 im Zellpellet nachweisbar ist, konnte das Protein auch im Überstand detektiert werden, allerdings wesentlich schwächer als die wildtypischen Variante. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass endogenes TXNDC16 sezerniert wird und somit die maskierte DKEL-Sequenz keine Retentionsfunktion besitzt.

Zur Bestätigung dieser Erkenntnis wurden in einem weiteren Versuch vier Konstrukte des grünfluoreszierenden Proteins GFP auf Plasmidebene hergestellt (siehe Abbildung 12A).

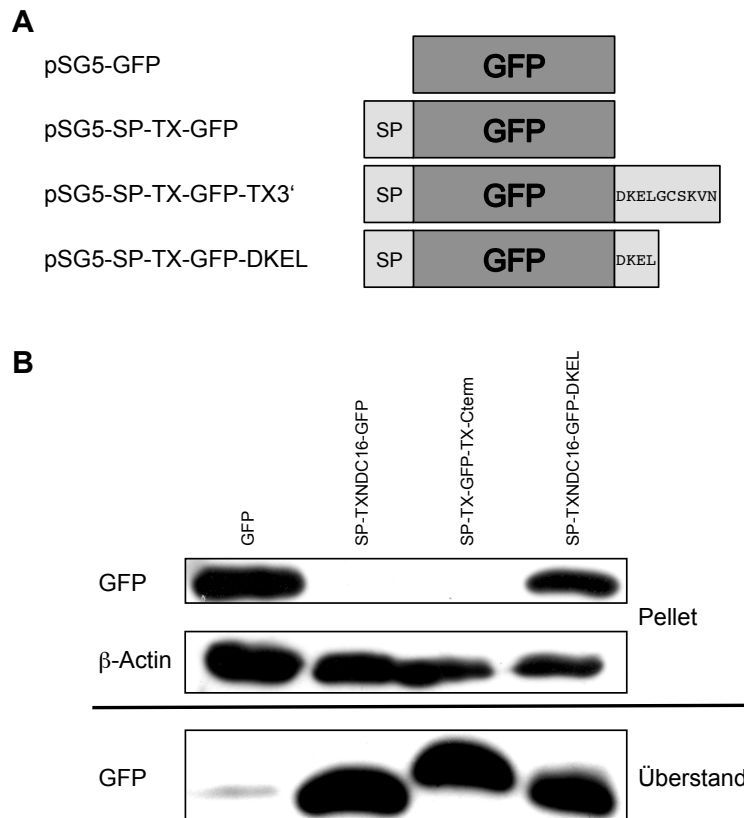


Abbildung 12: Sezernierung von GFP in Abhängigkeit des Amino- & Carboxyterminus. (A) Schematische Darstellung der vier exprimierten Proteinvarianten von GFP nach Transfektion von HEK293-Zellen mit den jeweiligen Plasmidkonstrukten. SP = TXNDC16-Signalpeptid. (B) Immunodetektion der GFP-Varianten im Zellpellet von HEK293-Zellen sowie nach TCA/Aceton-Fällung im Zellkulturüberstand. Die Detektion der GFP-Varianten erfolgte mittels polyklonalem α-GFP-Antikörper. GFP wird kaum sezerniert und ist daher hauptsächlich im Proteinlysat. SP-TXNDC16-GFP durchläuft in Folge des Signalpeptids von TXNDC16 den sekretorischen Weg und wird sezerniert. Auf Grund der ER-Retentionssequenz DKEL verbleibt ein Teil des Proteins intrazellulär. Das C-terminale Ende von TXNDC16 zeigt keine ER-Retention (SP-TX-GFP-TX-Cterm). Das Strukturprotein β-Actin dient als Ladungskontrolle.

Ausgehend von dem Plasmid pSG5-GFP, welches für das ubiquitär exprimierte, wildtypische eGFP (*enhanced* GFP) kodiert, wurden drei Varianten von GFP kloniert. Alle drei Varianten besitzen am N-Terminus das Signalpeptid von TXNDC16, unterscheiden sich aber am C-Terminus: eine Variante ist unverändert (SP-TXNDC16-GFP), die zweite Variante besitzt im Anschluss an die GFP-Sequenz die letzten zehn Codons des wildtypischen TXNDC16-C-Terminus mit maskierter DKEL-Sequenz (pSG5-SP-TX-GFP-TX3'), und die dritte Variante besitzt die DKEL-Sequenz direkt am C-Terminus (pSG5-SP-TX-GFP-DKEL). Diese vier Plasmide wurden ebenfalls in HEK293-Zellen transfiziert und transient exprimiert. Die Proteinlysate der Zellen sowie die Proteine aus dem Zellkulturüberstand wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und GFP im Western Blot mittels Immunodetektion nachgewiesen (siehe Abbildung 12B).

Das ubiquitär exprimierte GFP ist deutlich im Proteinlysate der HEK293-Zellen nachweisbar und sehr schwach im Zellkulturüberstand detektierbar. Eine artifizielle Sezernierung von GFP über nicht klassische Wege bei Überexpression in Zelllinien ist bereits bekannt [53]. Sowohl die GFP-Variante mit unverändertem C-Terminus, als auch die Variante mit der maskierten DKEL-Sequenz sind nur im Zellkulturüberstand nachweisbar, jedoch nicht im Proteinlysate. Sie durchlaufen folglich den sekretorischen Weg, während die GFP-Variante mit C-terminaler DKEL-Sequenz wiederum im Zellpellet und im Überstand nachweisbar war, was daraufhin deutet, dass in diesem Fall die DKEL-Sequenz zumindest zum Teil eine Retention des Proteins in der Zelle bewirkt. Dass diese GFP-Variante trotz funktioneller DKEL-Sequenz im Überstand nachweisbar ist, ist womöglich mit einer Übersättigung der KDEL-Rezeptoren und anschließender artifizieller Sezernierung des überexprimierten GFP zu erklären [54].

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine Sezernierung des endogenen TXNDC16 hin.

4.1.8 Keine exosomale Lokalisation von TXNDC16 im Zellkulturüberstand

Nachdem TXNDC16 im Zellkulturüberstand verschiedener etablierter Zelllinien nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob TXNDC16 im Überstand frei vorliegt oder in Exosomen lokalisiert ist. Die Annahme der putativen exosomalen Lokalisation beruhte auf der Arbeit von Gonzalez-Begn  *et al.*, die im Jahre 2009 TXNDC16 mittels massenspektrometrischer Analyse in Exosomen von humanen Ohrspeicheldr sen identifizieren konnten [55].

Ob TXNDC16 in Exosomen anderer Zellen bzw. Zelllinien nach Sezernierung lokalisiert ist, wurde in der vorliegenden Arbeit an HEK293-Zellen untersucht. Diese wurden dazu in einem FCS-haltigen Medium kultiviert, welches zuvor mittels Ultrazentrifugation von bovinen Exosomen befreit wurde. Anschließend wurden die HEK293-Zellen mit dem Plasmid pSG5-myc-TXNDC16 transfiziert, wodurch eine mit einem N-terminalen myc-Tag fusionierte, sonst aber wildtypische TXNDC16-Variante transient exprimiert wurde. Die Zellen wurden für mehrere Tage in Exosomen-freiem Medium kultiviert um sekretorische Proteine anzureichern. Der Überstand wurde geerntet und die von den HEK293-Zellen abgeschnürten Exosomen mittels Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand pelletiert. Die Proteine wurden anschließend aus dem Exosomen-freien Überstand mittels TCA/Aceton-F llung gewonnen. Ebenso wurde ein Proteinlysate der HEK293-Zellen hergestellt. Proteinlysate, Exosomen und Proteine aus dem Exosomen-freien Überstand wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und TXNDC16 mittels polyklonalem myc-Antikörper im Western Blot detektiert. Der Nachweis der Exosomen erfolgte mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen den exosomalen Marker CD63. Ein monoklonaler Antikörper gegen das Strukturprotein β -Actin wurde zur Kontrolle einer möglichen Kontamination von extrazellulären mit intrazellulären Proteinen verwendet.

Die myc-getaggte TXNDC16-Variante konnte nach transients Expression in HEK293-Zellen nicht in deren Exosomen, wohl aber im Exosomen-freien Überstand nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13A). Zwar konnten nicht alle Exosomen mittels Ultrazentrifugation pelletiert werden, jedoch zeigt sich nach Immunodetektion mittels CD63-Antikörper eine Anreicherung der Exosomen im Pellet des ultrazentrifugierten Überstandes, nicht aber von TXNDC16.

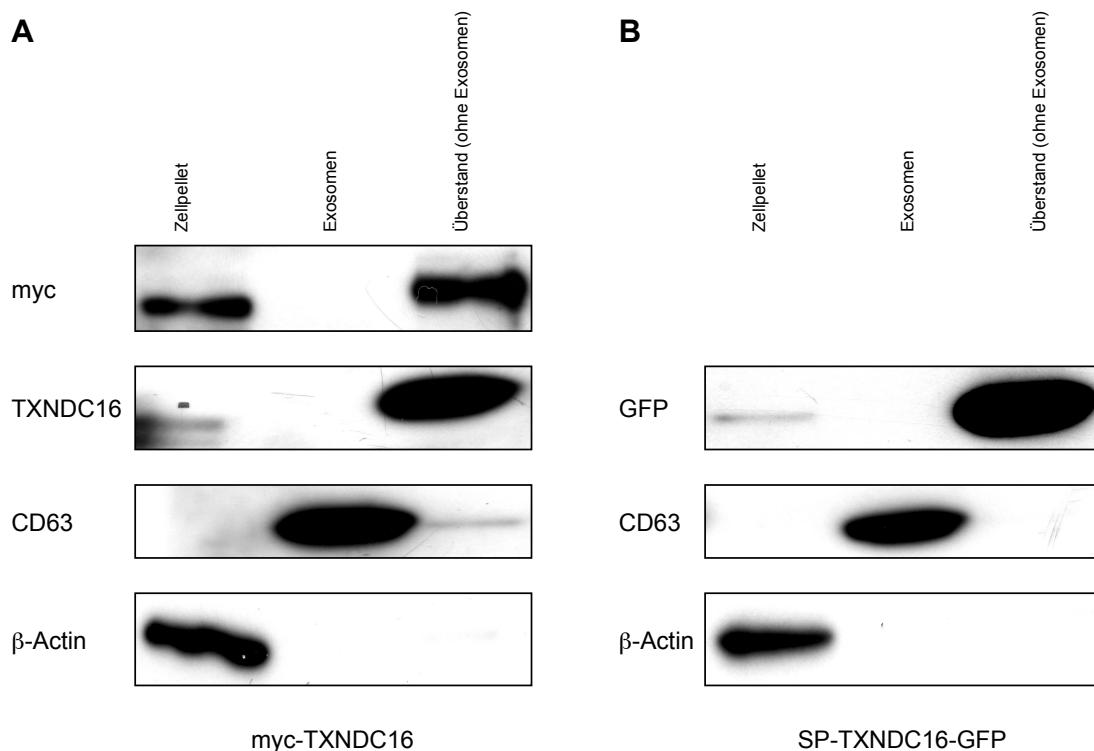


Abbildung 13: Keine exosomale Lokalisation von TXNDC16 und SP-TXNDC16-GFP im Überstand von HEK293-Zellen. (A) myc-TXNDC16 und (B) SP-TXNDC16-GFP werden nicht exosomal von HEK293-Zellen sezerniert. Zur Detektion von myc-TXNDC16 diente ein polyklonaler myc-Antikörper bzw. ein TXNDC16-spezifischer Antikörper. GFP wurde mittels eines polyklonalen GFP-Antikörpers nachgewiesen. Die Exosomen wurden mit einem Antikörper gegen den exosomalen Marker CD63 detektiert. β-Actin wurde als intrazelluläres Protein für das Zelllysat nachgewiesen.

In einem weiteren Versuch wurden HEK293-Zellen analog mit dem Plasmid pSG5-SP-TX-GFP transfiziert um das mögliche Sezernierungsverhalten einer GFP-Variante mit N-terminalem Signalpeptid von TXNDC16 zu untersuchen. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass diese GFP-Variante sezerniert wird (siehe Kapitel 4.1.7). Es stellte sich auch hier die Frage ob GFP nun exosomal oder im Exosomen-freien Medium lokalisiert ist. Der Nachweis von GFP erfolgte mittels eines polyklonalen GFP-Antikörpers.

GFP zeigt das gleiche Sezernierungsverhalten wie TXNDC16. GFP konnte nicht in den Exosomen nachgewiesen werden, ist jedoch wie TXNDC16 im Exosomen-freien Überstand lokalisiert (siehe Abbildung 13B).

Diese Daten deuten daraufhin, dass TXNDC16 bei HEK293-Zellen über einen nicht-exosomal Weg in den extrazellulären Raum sezerniert wird.

4.2 Peptidarray zur Bestimmung immunogener Epitope von TXNDC16

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es mithilfe eines Peptidarrays immunogene Epitope von TXNDC16 zu identifizieren, und zwar anhand von Autoantikörpern im Serum von Meningeompatienten und normalen Kontrollen, d. h. von Personen, die zum Zeitpunkt der Blutabnahme an keiner bekannten Erkrankung litten. TXNDC16 wurde zuvor in der Arbeitsgruppe von Comtesse *et al.* mittels SEREX-Verfahren als Meningeom-assoziiertes Antigen identifiziert. Eine Seroreaktivität, d. h. das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen TXNDC16 konnte dabei nur in Seren von Meningeompatienten festgestellt werden, nicht jedoch in Seren der gesunden Kontrollen [4]. Mit einer höheren Anzahl an Seren konnte in der Arbeit von Keller *et al.* dieses Ergebnis bestätigt werden [8].

Es stellte sich somit die Frage, ob bestimmte lineare Epitope von TXNDC16 existieren, die von Autoantikörpern in Meningeomseren bevorzugt erkannt werden. TXNDC16 wurde dazu in insgesamt 163 Peptide (15mer) unterteilt, mit einer Überlappung von je 10 Aminosäuren (siehe Tabelle 15, Anhang). Diese wurden auf einen Peptidarray als Duplikate gespottet und C-terminal kovalent mit der Zellulosemembran verbunden. Der Array wurde anschließend mit einem entsprechenden Serum über Nacht inkubiert und gebundene Autoantikörper im Serum mithilfe eines sekundären Cy5-gekoppelten Antikörpers gegen die konstante Region humaner Immunglobuline der Klasse IgA, IgM und IgG nachgewiesen. Bei jedem Durchgang wurde ein Array nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert um unspezifische Bindungen auszuschließen. Es wurden insgesamt 24 Meningeomseren und 19 Kontrollseren untersucht.

4.2.1 Datenprozessierung

Da die ausgewerteten Peptidarrays stark unterschiedliche Intensitätsverteilungen aufwiesen, wurden die Arraydaten mit gängigen Methoden normalisiert. Da bisher für Peptidarrays in der Literatur keine standardisierten Normalisierungsmethoden beschrieben sind, wurde zunächst die Quantil-(QN)-Normalisierung gewählt, die jedoch hauptsächlich bei Nukleotidarrays Verwendung findet. Es zeigte sich, dass die QN-Normalisierung für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Peptidarrays nicht hinreichend war, sodass im weiteren Verlauf eine Einteilung der Intensitätswerte der

Peptidarrays anhand von gewählten Thresholds durchgeführt wurde. Zunächst wurden einige der Arrays, die mit Meningeom- und Normalseren inkubiert wurden, visuell auf seropositive und -negative Peptide von TXNDC16 untersucht, klassifiziert und deren relative Verteilung im Bezug auf die Gesamtanzahl ($n = 163$) der vorhandenen Peptide bestimmt (siehe Abbildung 14).

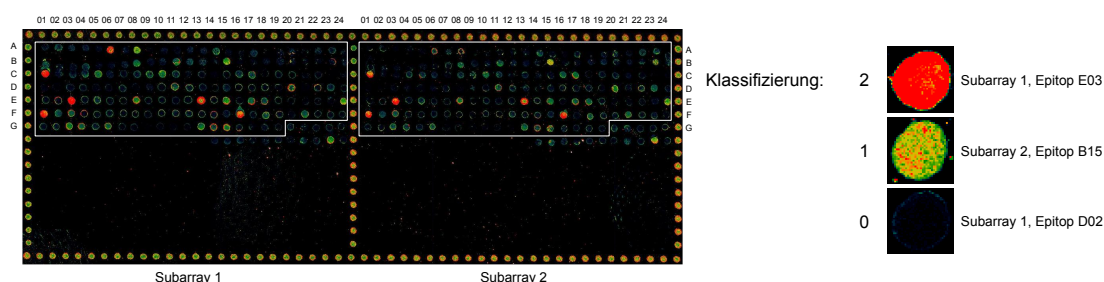


Abbildung 14: Klassifizierung der Peptide nach Seropositivität und Seronegativität. Rote Spots repräsentieren seropositive Epitope (z. B. E03, Subarray 1, Wert = 2). Spots mit gelb-roten Farbanteilen (z. B. B15, Subarray 2) wurden als schwach seropositiv klassifiziert (Wert = 1). Die restlichen Spots wurden als seronegativ klassifiziert (Wert = 0). TXNDC16 wird von den Epitopen A01 bis G19 (weiße Umrandung) repräsentiert.

Eindeutig seropositiven Peptide wurde der Wert „2“ zugeteilt, schwach seropositiven Peptiden der Wert „1“ und seronegativen Epitopen der Wert „0“. Dabei wurden die Intensitätswerte der gescannten Spots, die für die Stärke der Bindung von Serumantikörpern gegen ein spezifisches Epitop stehen, als Falschfarben dargestellt (blau = schwache Intensität, gelb = mittlere Intensität, rot = starke Intensität). Im Durchschnitt waren ca. 5 % der Peptide von TXNDC16 nach optischer Auswertung eindeutig seropositiv und weitere 15 % schwach seropositiv. Die restlichen Peptide wurden als seronegativ klassifiziert. Auch wenn zuvor von Keller et al. mittels Spotassay keine Seroreaktivität gegenüber TXNDC16 bei Normalseren nachweisbar war, treten durch diese Klassifizierungsmethode somit auch seropositive Peptide bei den Kontrollarrays auf [8]. Alle Peptide eines Peptidarrays wurden nach den in Tabelle 11 aufgelisteten Thresholds klassifiziert.

Tabelle 11: Klassifizierung der TXNDC16-Peptide nach Verteilung der Intensitäten

Threshold	Klassifizierung
5 %-intensitätsstärkste Peptide	2 = seropositiv
20 %-intensitätsstärkste Peptide	1 = schwach seropositiv
Restliche Peptide	0 = seronegativ

Da jeder Peptidarray aus zwei Subarrays besteht (technische Replikate), wurden die zugeordneten Klassifikationswerte eines Subarrays mit dem Wert des anderen Subarrays multipliziert. Dies bedeutet, dass ein Peptid, welches auf beiden Subarrays zu den 5 %-intensitätsstärksten Peptiden zählt, den endgültigen Wert „4“ erhält. Ein Peptid welches auf einem Subarray als seropositiv, jedoch auf dem anderen Subarray als seronegativ klassifiziert wird, erhält somit den Wert „0“. Die Klassifizierung der Peptide für alle Peptidarrays ist in der Heatmap in Abbildung 15 dargestellt.

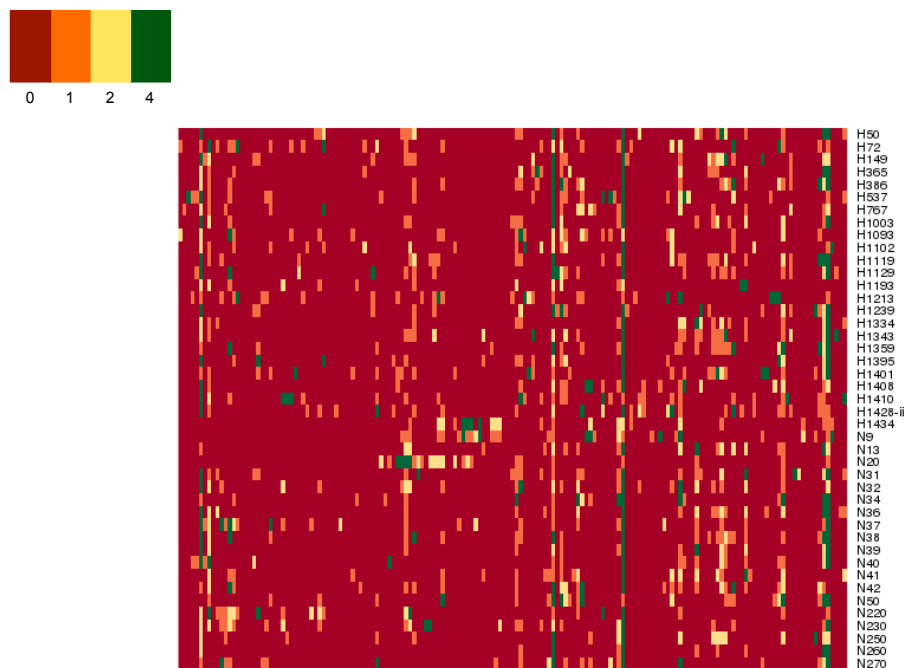
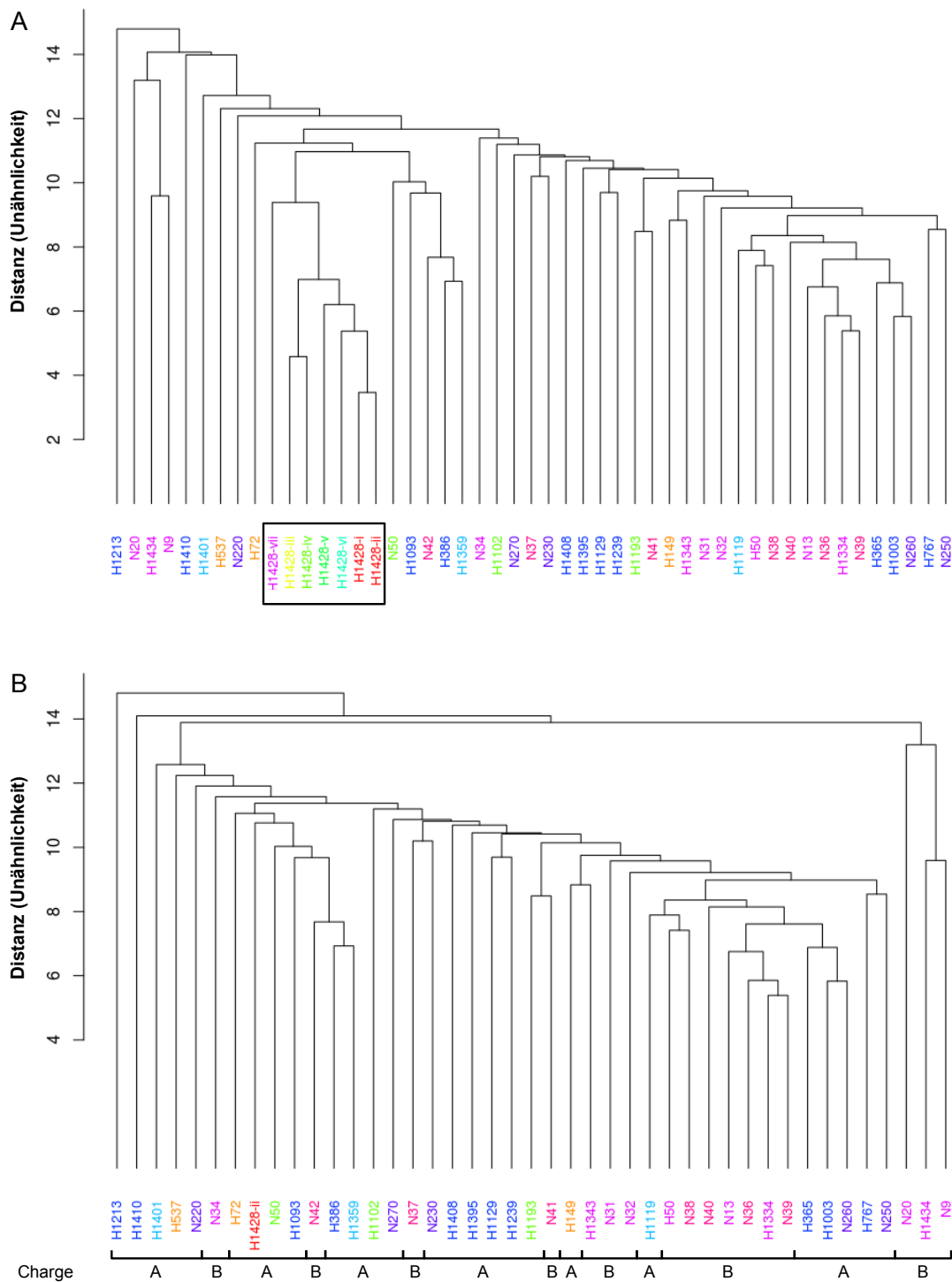


Abbildung 15: Heatmap der Peptidintensitätswerte nach Threshold-basierender Klassifizierung. Die Werte sind horizontal, sortiert nach aufsteigender Peptidnummerierung, graphisch dargestellt. Für das Serum H1428 wurden zur weiteren Auswertung die klassifizierten Werte des Arrays H1428-ii verwendet.

Abbildung 15 zeigt die Verteilung der zugeordneten Klassifizierungswerte für jeden Peptidarray, wobei für H1428 stellvertretend der Peptidarray H1428-ii betrachtet wurde (siehe Tabelle 16, Anhang). Auf Basis dieser Klassifizierung der Peptidintensitätswerte ist im hierarchischen Dendogramm in Abbildung 16A zu erkennen, dass alle Peptidarrays des Serums H1428 in einem Cluster liegen und die Verwendung der Arrays somit serumspezifisch und reproduzierbar ist. Abbildung 16B stellt die Verteilung der Peptidarrays farblich nach einzelnen Durchgängen und Chargen dar und verdeutlicht die homogene Verteilung nach der Threshold-basierenden Klassifizierung.



Anhand einer Korrelationsheatmap in Abbildung 17A sind die Korrelationen aller Peptidarrays des Serums H1428 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass der Peptidarray H1428-vii, der aus einer anderen Charge als die restlichen Peptidarrays des gleichen Serums stammt, am schlechtesten mit den übrigen Arrays korreliert. Dies zeigt, dass die Array-Charge generell einen Einfluss auf die Auswertung der Arraydaten ausübt. Die schlechteste Korrelation besteht zwischen dem Array H1428-vii und dem Array H1428-v. Bei letzterem handelt es sich um den Array, der mit einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:2.000 behandelt wurde. Eine ähnlich schlechte Korrelation erhält man zwischen H1428-vii und H1428-vi. Der Array H1428-vi wurde mit einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:5.000 inkubiert. Des Weiteren zeigt sich, dass der Array H1428-iii, welcher mit dem Sekundärantikörper gegen das humane Immunglobulin IgG gerichtet ist, mit H1428-v am schlechtesten korreliert. Die beste Korrelation wird hingegen zwischen den beiden Arrays H1428-ii und H1428-iv erzielt, die beide mit den gleichen Bedingungen bearbeitet wurden.

Auch wenn die Korrelation verschiedener Peptidarrays eines Serums unter verschiedenen Bedingungen sehr schwankt, ist das Muster an seropositiven und seronegativen Peptiden (Epitopmuster) vergleichbar (siehe Abbildung 17B). Für eine nachfolgende Identifizierung Meningeom- bzw. Normalseren-spezifischer TXNDC16-Epitope ist die serologische Untersuchung der Peptidarrays somit hinreichend.

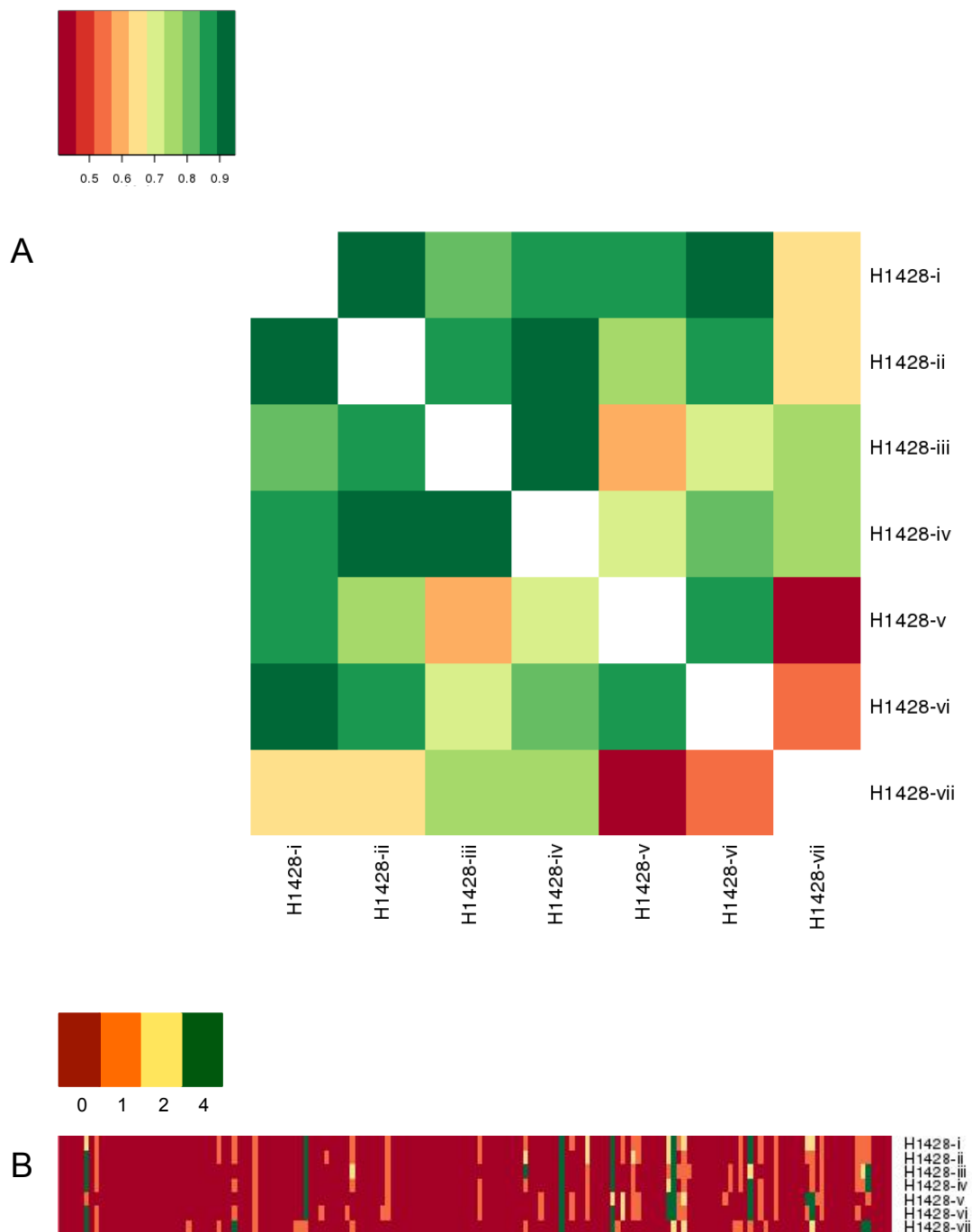


Abbildung 17: Korrelation der H1428-Peptidarrays. (A) Heatmap der Korrelationen der H1428-Arrays untereinander. Die beste Korrelation ergibt sich für den Array H1428-i mit den Arrays H1428-ii bzw. H1428-vi, sowie für den Array H1428-iv mit H1428-ii bzw. H1428-iii. Die schlechteste Korrelation besteht zwischen dem Peptidarray H1428-v (Charge A) mit H1428-vii (Charge B). (B) Peptidarray-Intensitätswerte der H1428-Peptidarrays nach Threshold-Klassifizierung (Ausschnitt aus Abbildung 14A). Die seropositiven Peptide (Wert = 2 bzw. 4) stimmen bei fast allen H1428-Peptidarrays überein. Die größte Abweichung des Epitopmusters zeigt der Array H1428-vii, wobei die Seroreaktivität einiger Peptide lediglich in der Intensität sich unterscheiden.

4.2.2 Klassifikation von Meningeomseren anhand spezifischer Epitopmuster

Das primäre Ziel der Peptidarray-Analyse ist die Identifikation von TXNDC16-Epitopen, die durch Autoantikörper in Meningeomseren erkannt werden, jedoch nicht durch Autoantikörper in Normalseren.

Es stellte sich zusätzlich die Frage, ob es möglich ist anhand des Musters aller seroreaktiven Peptide eines Serums die Gruppe der Meningeomseren von der Gruppe der Normalseren zu trennen. Bezieht man für diese Berechnung alle Peptide mit ein, so lassen sich Meningeomseren von Normalseren mit einer Genauigkeit von 58,4 %, einer Spezifität (Richtignegativrate) von 30,3 % und einer Sensitivität (Richtigpositivrate) von 80,6 %, voneinander trennen. Eine Genauigkeit von ungefähr 50 %, wie in diesem Fall, entspricht dabei der Wahrscheinlichkeit, ein Serum der richtigen Gruppe zuzuordnen, die durch Raten erreicht werden kann.

Zur Verbesserung der Trennung zwischen Meningeom- und Normalseren wurde in der folgenden Berechnung eine *Feature Selection* durchgeführt, d. h. es wurden bestimmte Epitope ermittelt, mit deren Hilfe eine Trennung effizienter, die Genauigkeit also somit erhöht werden könnte. Von den insgesamt 163 Peptiden von TXNDC16 auf den Peptidarrays wurden fünf Epitope ermittelt, die für die Differenzierung der Meningeomseren von den Normalkontrollen einen hohen informellen Gehalt haben. Die Klassifikation der Meningeom- und Normalseren anhand dieser fünf Epitope, die in Tabelle 12 zusammengefasst sind, erhöht die Genauigkeit auf 87,2 %, die Spezifität auf 83,7 % und die Sensitivität auf 90,0 %.

Tabelle 12: Ergebnisse der Trennung der Meningeomseren von Normalseren mit allen Peptiden und nach *Feature Selection*

Features	Genauigkeit	Spezifität	Sensitivität
Alle Peptide	53,8 %	24,2 %	77,3 %
A12, B18, C08, D19, G06	87,2 %	83,7 %	90,0 %

Die in Abbildung 18 dargestellte Heatmap fasst die fünf informellen Epitope aller Arrays zusammen. Es ist zu erkennen, dass Epitop G06 bei keinem Normalserum seropositiv ist, jedoch in zwei von 24 Meningeomseren moderat seropositiv (Wert = 2) und in sieben von 24 Meningeomseren schwach seropositiv (Wert = 1). Das Epitop G06 ist somit Meningeom-spezifisch. Ein weiteres Epitop, das für die Trennung von Meningeom- und Normalseren dient, ist Epitop B12. Dieses Epitop ist zwar bei einem von 19 Normalseren schwach seropositiv, jedoch bei drei von 24 Meningeomseren stark seropositiv, bei je einem moderat bzw. schwach seropositiv. Das Epitop B12 zeigt somit eine Meningeom-assoziierte Seroreaktivität. Epitop A12 und Epitop D19 sind Epitope, die zwar relativ schwach seropositiv sind, dies jedoch hauptsächlich bei den Normalseren. Epitop A12 ist bei fünf von 19 Normalseren schwach positiv, aber nur bei einem von 24 Meningeomseren. Epitop D19 ist sogar bei keinem Meningeomserum seropositiv, jedoch bei einem Normalserum moderat seropositiv und bei drei schwach seropositiv.

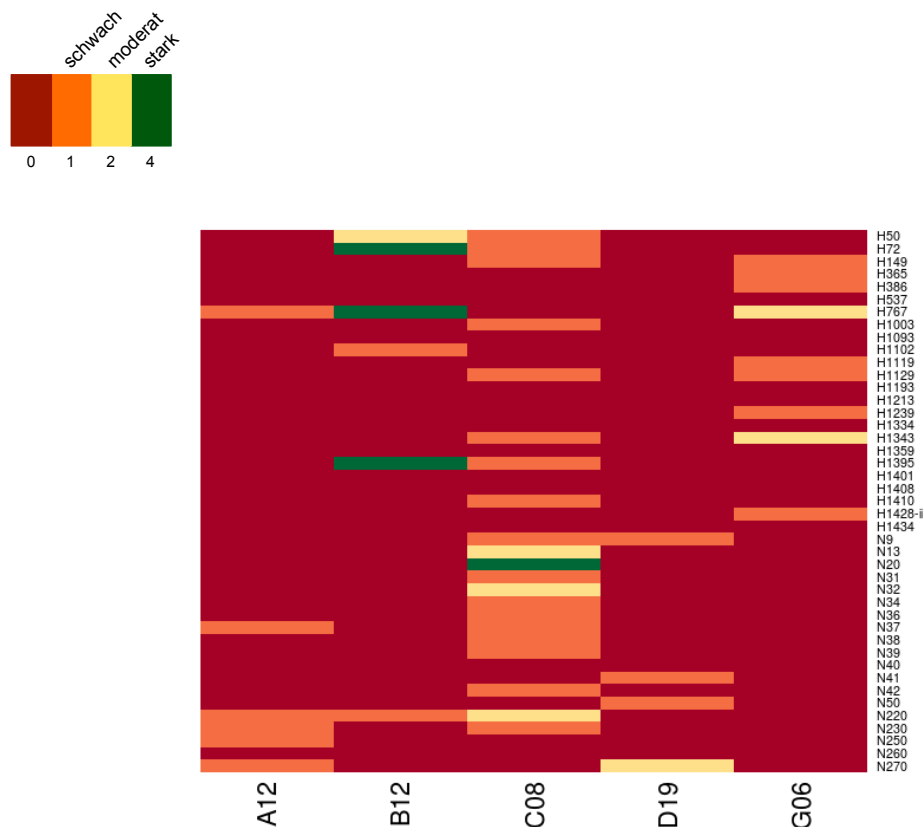


Abbildung 18: Feature Selection zur Trennung der Meningeom- von Normalseren anhand seroreaktiver Epitope. Heatmap der Intensitätswerte der fünf informellen Epitope. Das Epitop B12 zeigt eine Meningeom-assoziierte und das Epitop G06 eine Meningeom-spezifische Seroreaktivität. Während das Epitop A12 bei einem Meningeomserum und fünf Normalseren schwach seropositiv ist, ist das Epitop D19 bei keinem Meningeomserum seropositiv, jedoch bei drei Normalseren schwach und bei einem Normalserum moderat seropositiv.

In Tabelle 13 sind die Peptidsequenzen der fünf informellen Epitope sowie deren Position im TXNDC16-Protein aufgelistet.

Tabelle 13: Peptidsequenz und Position der fünf informellen Epitope im TXNDC16-Protein

Epitop	Peptidsequenz	Position in TXNDC16 [aa]
A12	PRTSVFLEELNEAVR	56-70
B12	VMEAAFVYGTTYQFV	176-190
C08	IVSQQATYEADRRTA	276-290
D19	DWSDVCTKQNVTEFP	451-465
G06	YDFLSMIDAATSQRG	746-760

Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei einigen der fünf Epitope um eine Kreuzreaktion von Antikörpern handelt, die nicht gegen Peptide von TXNDC16 gerichtet sind, sondern beispielsweise gegen Peptide pathogener Krankheitserreger wie Pilze, Bakterien oder Viren. Eine Auswahl linearer Peptide, die durch BLAST-Analysen Sequenzhomologien zu den in Tabelle 13 informellen Epitopen zeigen, und somit möglicherweise Kreuzreaktionen zu TXNDC16 begünstigen, ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Sequenzhomologien der informellen Epitope von TXNDC16 zu Proteinen aus Bakterien und Pilzen

Epitop	Homologe Sequenz	Protein	Sequenz-ID	Organismus/Virus
A12	VFLEELNEA	Pc14g01460	XP_002560140.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	LEELNEAV	Diguanylate Cyclase (GGDEF) Domain Protein	CCM01428.1	<i>Ruminococcus albus</i>
B12	EAAFVYGTT	Sulfatadenyltransferase	YP_302492.1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	GTTYQFV	Malto-Oligosyltrehalose Trehalohydrolase	WP_001013364.1	<i>Escherichia coli</i>
C08	QQATYEAD	Hypothetisches Protein	WP_000526060.1	<i>Salmonella enterica</i>
	QQATYE	Oxidoreduktase	WP_001031820	<i>Escherichia coli</i>
D19	KQNVTEF	Chalconsynthase	WP_019379749.1	<i>Bacillus oceanisediminis</i>
	WSDVC	Glykosyltransferase	CDA85493.1	<i>Clostridium spec.</i>
G06	LSMIDAATS	α/β -Hydrolase	EMF09027.1	<i>Sphaerulina musiva</i>
	FLSMI	3-Methyl-2-Oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase	WP_005994958.1	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei der Betrachtung aller der insgesamt 163 Peptide von TXNDC16, die auf den Peptidarrays gespottet sind, kein Gruppen-spezifisches Muster erkennbar ist. Leidglich ein Epitop (G06) der insgesamt 163 TXNDC16-Peptide konnte, wenn auch schwach, als Meningeom-spezifisch und ein Epitop (B12) als Meningeom-assoziiert ermittelt werden. Mithilfe von fünf der 163 Peptide ist es jedoch mit einer guten Genauigkeit von 87,2 % gelungen, die Gruppe der verwendeten Meningeomseren von der Gruppe der verwendeten Normalseren zu trennen.

5 Diskussion

TXNDC16 wurde von Comtesse *et al.* mithilfe des SEREX-Verfahrens als Meningeom-assoziiertes Antigen identifiziert [4]. In einer Folgearbeit von Keller *et al.* konnte eine Seroreaktivität gegenüber TXNDC16 bei 22 % der Seren von Meningeompatienten, aber bei keiner der getesteten gesunden Kontrollen gezeigt werden [8]. Des Weiteren lag die mRNA-Expression von *TXNDC16* im Tumor von seropositiven Patienten im Durchschnitt um das Dreifache höher als bei seronegativen Patienten [9]. Eine weitere Arbeit identifizierte TXNDC16, in der Studie als ER Protein 90 kDa (ERp90) bezeichnet, als gelöstes Glykoprotein des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und Interaktionspartner von ERFAD (*ER flavoprotein associated with degradation*) [56].

Auf Grund meiner Expressions- und Funktionalitätsuntersuchungen spezifischer Proteindomänen von TXNDC16, die im Zuge dieser Arbeit durchgeführt wurden, wird, basierend auf der Arbeit von Riemer *et al.*, eine neue Hypothese zu dessen subzellulären Lokalisation und Funktionalität vorgestellt. In der vorliegenden Arbeit konnte für TXNDC16, neben einer ER-assoziierten, zytosolischen Lokalisation *in vitro* ein sekretorisches Verhalten des Proteins nach co-translationaler Translokation ins ER gezeigt werden. Abbildung 19 veranschaulicht dabei graphisch den möglichen zellulären Weg von TXNDC16. Auf Grundlage vorheriger Untersuchungen scheint es sich bei TXNDC16 wahrscheinlich um ein zytosolisches und extrazelluläres Protein mit möglicher Thioredoxin-ähnlicher bzw. proteinbindender Funktion zu handeln.

Des Weiteren wurden mithilfe eines Peptidarrays die immunogenen Epitope von TXNDC16 bestimmt, die von Autoantikörpern der Meningeompatienten erkannt werden, und versucht, die Epitope zu identifizieren, mithilfe derer sich eine Unterscheidung von Meningeompatienten und gesunden Kontrollen mit möglichst hoher Genauigkeit erzielen lässt.

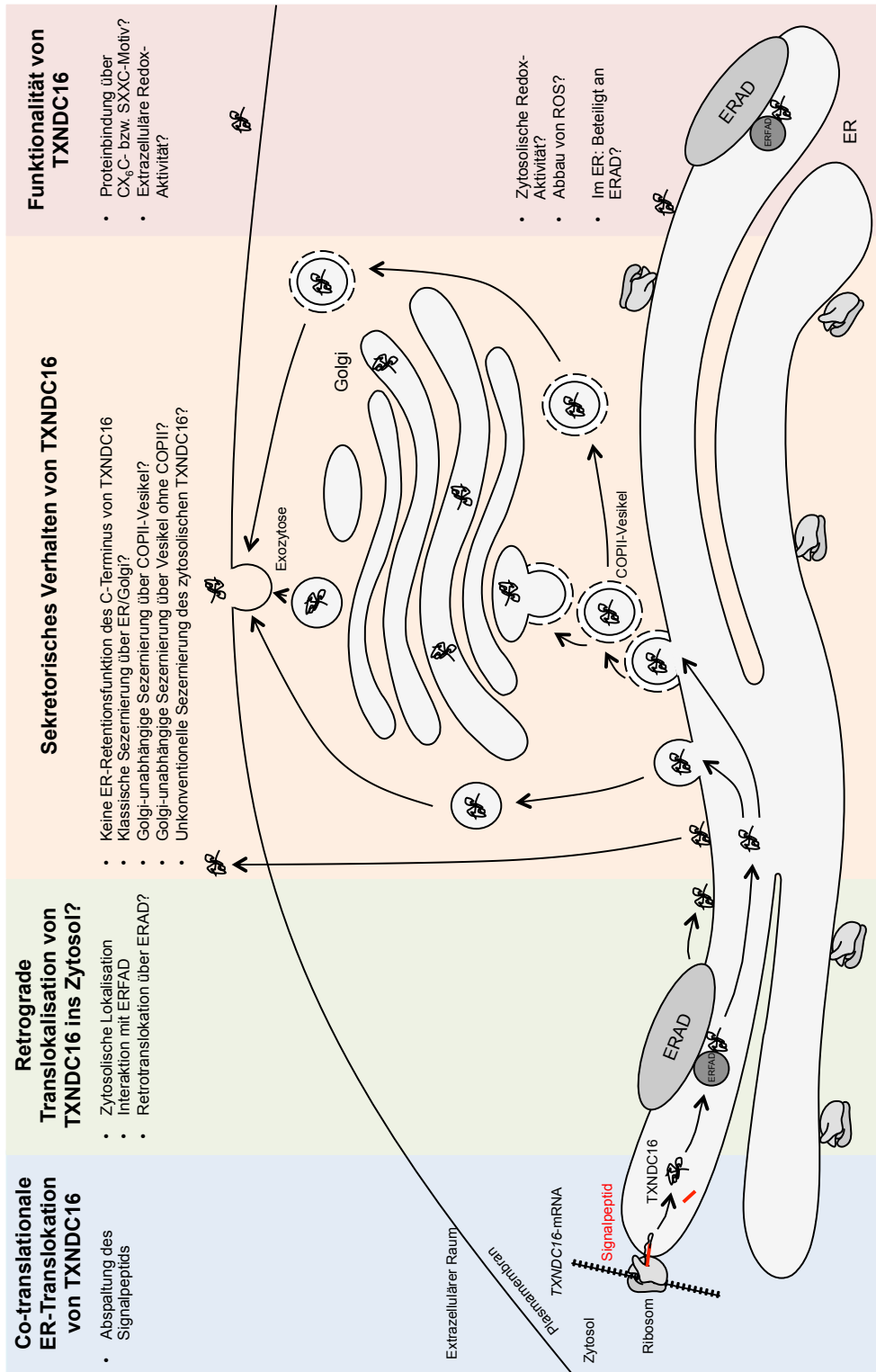


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Hypothese des zellulären Weges von TXNDC16. TXNDC16 wird über ein N-terminales Signalpeptid co-translational ins ER transloziert. Mittels Konfokalaufnahmen, FACS- und Western Blot Analysen wurde TXNDC16 als ER-assoziiertes zytosolisches Protein identifiziert. Auf Grund einer Interaktion mit ERFAD könnte TXNDC16 über den ERAD-Weg (ER associated degradation) ins Zytosol retrotransloziert werden und über hydrophobe Wechselwirkungen an der ER-Membran binden. Die Sezernierung von TXNDC16 wurde in verschiedenen Zelllinien gezeigt, ob dies über den klassischen ER/Golgi-abhängigen oder einen unkonventionellen Weg geschieht bleibt zu klären. Möglicherweise handelt es sich bei TXNDC16 um ein Thiorodoxin-ähnliches Protein mit Redox-Aktivität im Zytosol bzw. extrazellulär. Proteinbindende Eigenschaften bzw. eine Funktionalität bei der ER-assoziierten Degradation (ERAD) sind Bestandteil weiterer Untersuchungen.

5.1 Co-translationale Translokation von TXNDC16 ins ER

Das bioinformatische Programm „TargetP“ zur *in silico* Bestimmung subzellulärer Lokalisationen sagte für TXNDC16 ein sekretorisches Verhalten voraus. „SignalP“, ein Programm das putative Schnittstellen von Signalpeptiden vorhersagt, ermittelte in Version 3.0 für TXNDC16 am N-Terminus ein 27 Aminosäuren großes Signalpeptid, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit abgespalten werden würde [29,57]. In der momentan aktuellsten Version 4.1 wurde der für die Wahrscheinlichkeit der Abspaltung relevante Threshold angehoben (*cutoff* von 0,34 auf 0,5), wodurch laut „SignalP“ die ersten 27 Aminosäuren von TXNDC16 nun kein Signalpeptid mehr darstellen (siehe Abbildung 20A) [30]. Die Abspaltung einer Signalsequenz ist jedoch nicht obligatorisch. Neben Signalpeptiden existieren sogenannte Signalanker, die oftmals bei integralen Membranproteinen gefunden werden und als Transmembrandomäne eine Sekretion verhindern. Um zu überprüfen, ob das N-terminale putative Signalpeptid von TXNDC16 eine Funktionalität besitzt und für die ER-Translokation essentiell ist, wurde zunächst eine Deletionsvariante von TXNDC16 ohne Signalpeptid (Δ SP-TXNDC16-HA) hergestellt sowie eine GFP-Variante, welche N-terminal mit dem putativen Signalpeptid fusioniert wurde (SP-TXNDC16-GFP). Die Aminosäuresequenzen beider Konstrukte sowie die Aminosäuresequenz des wildtypischen GFP wurden ebenfalls mittels „SignalP“ ausgewertet. Für die Deletionsvariante Δ SP-TXNDC16-HA zeigte sich, dass erwartungsgemäß keine N-terminale Signalsequenz mehr vorhergesagt wird (siehe Abbildung 20B). Bei GFP, welches wildtypisch über keine N-terminale ER-Signalsequenz verfügt (siehe Abbildung 20C) wird nun aber das Signalpeptid von TXNDC16 im Fusionsprotein SP-TXNDC16-GFP von „SignalP“ erkannt und eine mögliche Abspaltung vorhergesagt, jedoch auch hier nur nach Verwendung des niedrigeren Thresholds von 0,34 (siehe Abbildung 20D). Alle vier Konstrukte wurden in HeLa-Zellen exprimiert und anschließend mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie analysiert. Die Aufnahmen in Abbildung 4 (siehe Kapitel 4.1.1) sowie in Abbildung 8 (siehe Kapitel 4.1.5) zeigten, dass TXNDC16 die Assoziation zum ER verliert, sobald das Signalpeptid nicht vorhanden ist und das Protein dadurch eine ubiquitäre zytosolische Lokalisation erhält (siehe Abbildung 8A, Kapitel 4.1.5), während GFP, welches wildtypisch ubiquitär in der Zelle verteilt ist eine subzelluläre Lokalisation im ER zeigt, sobald es mit dem N-terminalen Signalpeptid von TXNDC16 fusioniert wird (siehe Abbildung 8B & C, Kapitel 4.1.5).

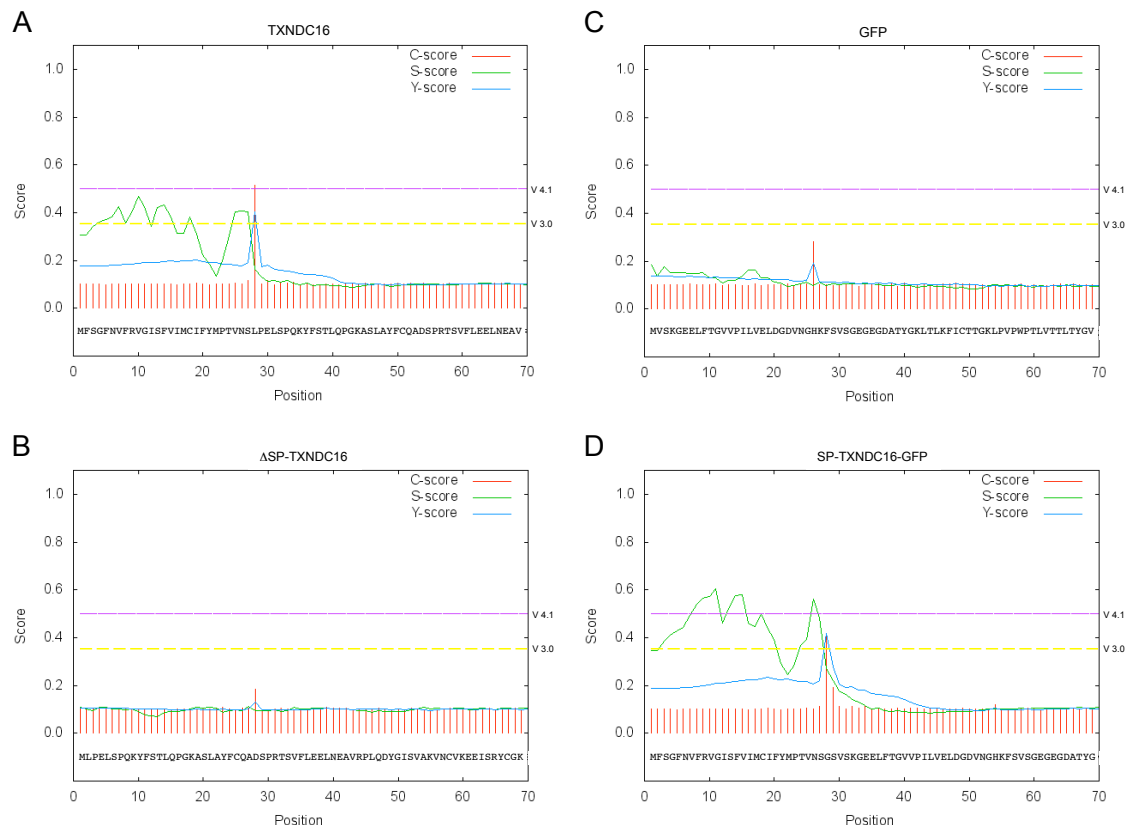


Abbildung 20: Graphische Darstellung mittels „SignalP“ generierter Vorhersagewahrscheinlichkeiten putativer Signalpeptide für TXNDC16- und GFP-Varianten. Zur Identifizierung möglicher N-terminaler Signalpeptide werden die Berechnungen für die jeweils ersten 70 Aminosäuren von (A) TXNDC16, (B) Δ SP-TXNDC16, (C) GFP und (D) SP-TXNDC16-GFP dargestellt. C-score = *cleavage site score*, Wahrscheinlichkeit einer Signalpeptidabspaltung. S-score = *signal peptide score*, Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines Signalpeptids, Y-score = Kombination aus C-score und S-score. V 3.0 = Threshold der „SignalP“ Version 3.0. V 4.1 = Threshold der „SignalP“ Version 4.1.

Bei Proteinen mit N-terminalem Signalpeptid unterscheidet man zwei Arten der Translokation ins ER, nämlich die co-translationale und die post-translationale Translokation. Während die co-translationale Translokation in der Regel in höheren eukaryotischen Zellen stattfindet, wird die post-translationale Translokation jedoch hauptsächlich in Hefezellen und Prokaryoten beschrieben [58,59]. Im Gegensatz zur post-translationalen Translokation erfolgt die co-translationale Translokation durch Bindung des in der Regel N-terminalen hydrophoben Signalpeptids einer entstehenden Polypeptidkette, welche aus dem sogenannten ribosomalen Tunnelausgang herausragt, am *signal recognition particle* (SRP). Dieser Ribonukleoprotein-Komplex, bestehend aus sechs Proteinen und der 7S SRP RNA, erkennt zwar keine spezifische Aminosäuresequenz des Signalpeptids, jedoch eine α -Helix, die aus mehreren hydrophoben Aminosäuren des Signalpeptids gebildet wird. Anschließend erfolgt dann

die Bindung des SRP an einem spezifischen SRP-Rezeptor und der damit verbundenen Bindung der polypeptidsynthetisierenden Ribosomen an einem sogenannten Translokon, einem heteromultimeren Proteinkomplex [51,60-62]. Bei der post-translationalen Translokation handelt es sich um einen SRP-unabhängigen Proteintransport vom Zytosol ins ER, d. h. es erfolgt keine co-translationale Bindung des entstehenden Signalpeptids am SRP, sondern das Protein wird zunächst komplett synthetisiert und anschließend transloziert [59,63]. Es gibt jedoch nur wenige bekannte Proteine, die in Säugerzellen post-translational transloziert werden, zu denen die kleinen Proteine Statherin und Apelin gehören. Ihre geringe Größe von 62 bzw. 77 Aminosäuren liefert eine mögliche Erklärung für den post-translationalen Transport, denn bevor die N-terminalen Signalpeptide während der Synthese dieser Proteine das Ribosom verlassen, werden die vollständig synthetisierten Proteine bereits freigesetzt [64,65]. Bei TXNDC16 handelt es sich mit 825 Aminosäuren jedoch um ein relativ großes Protein, dessen N-terminale Signalsequenz co-translational den ribosomalen Tunnelausgang verlässt und somit an das SRP binden kann. Obwohl eine mögliche post-translationale Translokation von TXNDC16 aus dem Zytosol ins ER erklärbar wäre, sprechen jedoch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen eher für die Theorie, dass TXNDC16 zunächst co-translational, also SRP-abhängig, ins ER transloziert wird. Würde TXNDC16 vollständig synthetisiert werden bevor es zur Translokation des Proteins ins ER kommt, wäre eine zytosolische Lokalisation womöglich ubiquitär ausgeprägt. Dies konnte mittels Konfokalmikroskopie jedoch nicht beobachtet werden.

Eine Abspaltung des mit ca. 3 kDa im Vergleich zum TXNDC16-Gesamtprotein relativ kleinen Signalpeptids konnte bei TXNDC16 zwar nicht gezeigt werden, dafür aber die Abspaltung des Signalpeptids nach Fusion mit GFP (siehe Abbildung 9, Kapitel 4.1.5). Die Ergebnisse sprechen daher für eine co-translationale Translokation von TXNDC16 ins ER. Auf Grund der wahrscheinlichen Abspaltung des Signalpeptids von TXNDC16 und der zytosolischen Assoziation an der ER-Membran könnte es sich bei TXNDC16 theoretisch um ein Typ-I-Transmembranprotein handeln. Bei diesen Proteinen kommt es zunächst zu einer co-translationalen Translokation des N-Terminus ins ER-Lumen bis die Translokation durch eine Stopptransfer-Sequenz unterbrochen und das Protein in der ER-Membran verankert wird. Der restliche C-terminale Teil ragt dabei ins Zytosol [66]. Für TXNDC16 ist bisher keine Stopptransfer-Sequenz bekannt. Falls diese jedoch vorhanden wäre, wäre dies eine Erklärung dafür, dass TXNDC16 sowohl eine Interaktion mit ERFAD eingeht, einem Protein, welches an der ER-assoziierten

Degradation beteiligt ist, als auch eine Detektion des Proteins im Zytosol mit einem TXNDC16-spezifischen polyklonalen Antikörper gegen dessen C-Terminus möglich ist. Gegen diese Theorie spricht jedoch das Ergebnis von Riemer *et al.*, die eine Carbonat-Extraktion der ER-Membran durchführten und TXNDC16 dabei als lösliches und nicht als membranintegrales Protein nachweisen konnten [56].

Trotz des Nachweises, dass das N-terminale TXNDC16-Signalpeptid essentiell für dessen ER-Translokation ist, wird dieses jedoch durch „SignalP“ mit der z. Z. aktuellsten Version 4.1, im Gegensatz zur letzten Version 3.0, nicht mehr als solches vorhergesagt. In früheren Arbeiten an Signalpeptiden wurde spekuliert, dass wegen der hohen Sequenzvariation der bekannten ER-Signalpeptide, sequenzabhängige Unterschiede in der Effizienz der co-translationalen Translokation der Signalpeptid-tragenden Proteine existieren könnten. Dies wurde zuvor bereits im Zusammenhang mit akutem ER-Stress beobachtet [67].

5.2 Retrograde Translokation von TXNDC16 ins Zytosol?

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von TXNDC16 wurden Zellen der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa mit einem Plasmidkonstrukt transfiziert, welches die cDNA von TXNDC16 sowie ein C-terminales Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) trägt. Die ER-assoziierte Lokalisation von TXNDC16, die von Riemer *et al.* zuvor gezeigt wurde, konnte zunächst mittels Konfokalmikroskopie bestätigt werden (siehe Abbildung 4, Kapitel 4.1.1) [56]. Im anschließenden Sequestrierungsversuch sollte ermittelt werden, ob TXNDC16 in Raue Mikrosomen (RM) transloziert wird. Dazu wurde das zuvor für die Konfokalmikroskopie verwendete Plasmid in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translationsansatz mit RM verwendet, der dann mit Proteinase K behandelt wurde. Nach Proteinase K-Verdau konnte keine TXNDC16-Bande nachgewiesen werden. Das Vorläufersubstrat wurde demnach nicht durch Translokation in die RM vor dem Proteinase K-Verdau geschützt. Dies wäre bei einem ER-luminalen bzw. sekretorischen Protein aber zu erwarten gewesen (siehe Abbildung 5, Kapitel 4.1.2).

Mithilfe eines molekularen Shift-Assays wurde die subzelluläre Lokalisation von TXNDC16 daher näher bestimmt. Zunächst wurde in HEK293-Zellen nach Transfektion eine TXNDC16-Variante mit N-terminalem myc-Tag nachfolgend dem putativen

Signalpeptid (myc-TXNDC16), sowie eine zytosolische TXNDC16-Variante mit N-terminalem myc-Tag ohne Signalpeptid (Δ SP-myc-TXNDC16) exprimiert. Die Zellen wurden anschließend selektiv permeabilisiert und mit Maleimid-Polyethylenglykol (malPEG) inkubiert, welches an zugängliche Cysteine kovalent bindet und pro gebundenem malPEG einen 5 kDa großen molekularen Shift des wildtypischen Proteins im Western Blot hervorruft. Schulman *et al.* konnten beispielsweise mithilfe dieses Assays die Topologie der Vitamin K-Epoxidreduktase (VKOR) in der ER-Membran bestimmen [68]. Nach Inkubation mit dem Plasmamembran permeabilisierenden Detergenz Digitonin konnte ein Shift von myc-TXNDC16 im Western Blot nachgewiesen werden, während der Shift bei dem luminalen ER-Protein PDI ausblieb. Die Deletionsvariante Δ SP-myc-TXNDC16 zeigte im Western Blot nach identischer Behandlung das gleiche Molekulargewicht wie myc-TXNDC16. Dies lässt darauf schließen, dass alle elf Cysteine von TXNDC16 malPEG binden und TXNDC16 somit ein zytosolisches ER-assoziiertes Protein ist (siehe Abbildung 6, Kapitel 4.1.3).

Die Hypothese der zytosolischen ER-Assoziation von TXNDC16 wurde in einem abschließenden Versuch mittels FACS-Analyse von HeLa-Zellen untermauert. Untransfizierte HeLa-Zellen wurden selektiv permeabilisiert und mit Antikörpern gegen das zytosolische Protein α -Tubulin, gegen das ER-luminale Protein PDI und gegen wildtypisches, endogenes TXNDC16 inkubiert. Die FACS-Analyse zeigte, dass die Antikörper gegen TXNDC16 und α -Tubulin schon nach Permeabilisierung mit Digitonin binden, nicht aber der Antikörper gegen PDI (siehe Abbildung 7, Kapitel 4.1.4). Diese Ergebnisse stehen nur auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Ergebnissen von Riemer *et al.*. Im Detail postulierten Riemer *et al.* eine luminale ER-Lokalisation von TXNDC16, nachdem sie das Protein mittels Western Blot nach alkalischer Lyse der ER-Membran von HEK293-Zellen in der löslichen Fraktion detektieren konnten [56]. Bei der alkalischen Lyse werden aber nicht nur ER-luminale, sondern auch ER-membranassoziierte Proteine von integralen ER-Membranproteinen getrennt. Daher ist auf Grund der Ergebnisse von Riemer *et al.* nicht ausgeschlossen, dass TXNDC16 ER-assoziiert auf der zytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert sein könnte. Zum Beispiel konnten Yamazaki *et al.* mithilfe eines Trypsin-Verdaus von präparierten Mikrosomen nachweisen, dass das Protein MIZ1 (Mizu-Kussei 1) in den Wurzelzellen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* ebenfalls auf der zytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert ist. Yamazaki *et al.* zeigten anschließend nach alkalischer Lyse mittels Na_2CO_3 , nach hoher Ionenkonzentration mittels NaCl sowie nach Inkubation mit

dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100, dass MIZ1 ausschließlich nach alkalischer Lyse in der löslichen Fraktion nachzuweisen ist. Sie postulierten daher eine hydrophobe Bindung von MIZ1 mit der ER-Membran [69]. Somit könnte TXNDC16 als zytosolisches ER-assoziiertes Protein ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen an die ER-Membran gebunden sein.

Im Weiteren postulierten Riemer *et al.*, dass TXNDC16 ein Glykoprotein sei, da endogenes TXNDC16 nach Inkubation mit dem Enzym Endoglycosidase H (EndoH) ein niedrigeres Molekulargewicht im Polyacrylamidgel aufweist als unbehandeltes TXNDC16. Das gleiche Ergebnis wurde nach Überexpression von N-terminal myc-getaggtm TXNDC16 unter Verwendung von EndoH erzielt. EndoH spaltet spezifisch zwischen den zwei N-Acetylglucosamin-Untereinheiten der glykosylierten Asparaginreste. Man ging lange davon aus, dass die N-Glykosylierung ausschließlich bei sekretorischen Proteinen vorkäme. Es zeigte sich jedoch, dass eine N-Glykosylierung unter bestimmten Bedingungen auch bei zytosolischen Proteinen zu finden ist [70-72]. Für das Glykoprotein Calreticulin (CRT), ein normalerweise ER-luminales Protein, konnte gezeigt werden, dass das Protein am zytosolischen Teil der Integrin- α -Untereinheit bindet und am nukleären Export des Glucocorticoid-Rezeptors beteiligt ist [73-75]. Des Weiteren konnte die zusätzliche zytosolische Lokalisation von CRT untermauert werden, nachdem eine Arginylierung des Proteins durch die zytosolisch lokalisierte Arginyltransferase bzw. Arginyl-tRNA zu beobachten war [76,77]. Henle *et al.* und Jethmalani *et al.* konnten außerdem zeigen, dass die zytosolische Lokalisation von CRT mit einer stress-induzierten N-Glykosylierung im ER einher geht [78,79]. Auch für Clusterin, ein sekretorisches Chaperon welches ausschließlich N-glykosyliert wird, ist bekannt, dass das normalerweise ER-luminale Protein im Zytosol lokalisiert sein kann und dort eine Funktionalität besitzt [80]. Für die zytosolische Variante konnten Zhang *et al.* eine Apoptose-inhibierende Funktion durch Bindung von Clusterin an das Protein Bax nachweisen, da die Bindung an Bax dessen Oligomerisierung und einen daraus resultierenden Ausstrom von Zytochrom C aus den Mitochondrien verhindert [81].

TXNDC16 wurde des Weiteren als Interaktionspartner des ER-luminalen Proteins ERFAD identifiziert, welches als Komponente der ER-assoziierten Degradation (ERAD) beschrieben wurde [56,82]. Das ERAD-System ist eine intrazelluläre Qualitätskontrolle für Proteine, die entweder unvollständig translatiert werden oder eine

nicht korrekte Faltung aufweisen. An die ERAD-Substrate werden dabei mehrere Ubiquitin-Ketten kovalent gebunden, sodass sie vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut werden können [83-86]. Über die mögliche Funktion von TXNDC16 im ERAD-System wird lediglich spekuliert. Zum einen wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass TXNDC16 an der Übergabe von falsch gefalteten Proteinen an das ERAD-Protein SEL1L beteiligt sei. Als Begründung wird die analoge Funktion der mit ERFAD interagierenden Proteine OS-9 und GRP94 genannt. Zum anderen könnte es sein, dass Substrate, die bereits an SEL1L oder OS-9 gebunden sind, durch einen Komplex aus ERFAD und TXNDC16 zu einem möglichen Retrotranslokationskanal dirigiert werden [56]. Die Retrotranslokation von Proteinen aus dem ER in das Zytosol ist noch nicht näher geklärt, wobei mehrere Theorien in der Literatur diskutiert werden [87,88]. Möglicherweise nutzt TXNDC16 die ERAD-Maschinerie der Retrotranslokation um ins Zytosol dirigiert zu werden.

Ob, und wenn ja, welchen retrograden Translokationsweg vom ER zum Zytosol TXNDC16 in der Zelle durchläuft, kann nicht genau gesagt werden. Fest steht jedoch, dass TXNDC16 auf Grund seiner N-Glykosylierung mit hoher Wahrscheinlichkeit zunächst co-translational ins ER transloziert wird und anschließend eine Bindung mit ERFAD eingeht, was somit für eine Retrotranslokation über das ERAD-System spricht.

5.3 Sekretorisches Verhalten von TXNDC16

TXNDC16 besitzt ein 27 Aminosäure großes N-terminales Signalpeptid, welches essenziell für die ER-assoziierte zytosolische Lokalisation des Proteins ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein am N-Terminus mit dem TXNDC16-Signalpeptid fusioniertes GFP im Gegensatz zur wildtypischen Variante ins ER transloziert wird (siehe Abbildung 8, Kapitel 4.1.5). Western Blot Analysen ergaben außerdem, dass TXNDC16 bei mehreren humanen Zelllinien im Zellkulturüberstand nachweisbar ist und TXNDC16 somit ein sekretorisches Protein ist (siehe Abbildung 7, Kapitel 4.1.4).

Sekretorische Proteine werden in zwei Gruppen unterteilt, in die Gruppe der konstitutiv sezernierten und die Gruppe der reguliert sezernierten Proteine. Zu den konstitutiv sezernierten Proteinen zählen zum einen die Serumproteine wie Albumin oder Transferrin, die von Hepatozyten sezerniert werden, aber auch die Immunglobuline der Lymphozyten. Zum anderen gehören dieser Gruppe die extrazellulären Matrixproteine wie Collagen oder Fibronectin an, die von Fibroblasten sezerniert werden. Zu den reguliert sezernierten Proteinen gehören die Peptidhormone wie Insulin, welches von den β -Zellen des Pankreas sezerniert wird, oder Endorphin aus neurosekretorischen Zellen, aber auch Enzyme des Verdauungssystems wie Trypsin oder Amylase. Der klassische Weg der Proteinsekretion beginnt zunächst mit der co-translationalen Translokation des synthetisierten Proteins ins ER-Lumen mit anschließender Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids. Das Protein wird dann in ca. 50 nm große Transportvesikel, sogenannte COPII-Vesikel (*coat protein complex II*), eingeschlossen, die sich vom ER lösen und das *cis*-Golgi-Netzwerk bilden. Nach Reifung der *cis*-Zisterne kommt es zur Reifung der *medial*- und anschließend der *trans*-Zisterne, welche dann Teil des *trans*-Golgi-Netzwerks wird. Dort wird das Protein bei regulierter Sekretion in sekretorischen Vesikeln gespeichert bis beispielsweise über hormonelle Stimuli die Fusionierung dieser Vesikel mit der Plasmamembran induziert wird. Bei konstitutiver Sekretion wird das Protein in Transportvesikel sortiert, die unmittelbar zur Plasmamembran wandern und dort über Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben werden [89]. Zu den sekretorischen Proteinen, die den klassischen Sekretionsweg durchlaufen gehört u. a. das humane Thioredoxin-like Protein hTLP19. Liu *et al.* konnten mittels Northern Blot Analysen zeigen, dass hTLP19 in vielen Geweben exprimiert wird und sich nach Überexpression in COS-7-Zellen im Überstand des Zellkulturmediums befindet [90]. Das Protein besitzt, wie TXNDC16, ein

N-terminales Signalpeptid, zeigt jedoch bei der subzellulären Lokalisation Unterschiede zu TXNDC16. So konnten Liu *et al.* zeigen, dass hTLP19 überwiegend im Golgi-Apparat lokalisiert ist, während TXNDC16 ausschließlich mit dem luminalen ER-Protein PDI co-lokalisiert (siehe Abbildung 4, Kapitel 4.1.1) [90]. Im Gegensatz zu TXNDC16 zeigt das N-terminal mit dem TXNDC16-Signalpeptid fusionierte GFP (SP-TXNDC16-GFP) neben einer subzellulären Lokalisation im ER zusätzlich eine starke Lokalisation im Golgi-Apparat (siehe Abbildung 5C, Kapitel 4.1.2). Da SP-TXNDC16-GFP im Vergleich zum wildtypischen GFP in HEK293-Zellen verstärkt sezerniert wird, scheint SP-TXNDC16-GFP daher den klassischen Sekretionsweg über das *trans*-Golgi-Netzwerk zu durchlaufen. Daher stellt sich die Frage, ob TXNDC16 womöglich einen anderen sekretorischen Weg durchläuft.

Der klassische ER/Golgi-abhängige Weg ist für eine Zelle nicht die einzige Möglichkeit Proteine zu sezernieren. So konnten Rubartelli *et al.* zeigen, dass das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β), welches von aktivierten Monozyten als Entzündungsmediator sezerniert wird, jedoch über keine N-terminale Signalsequenz verfügt, auch dann noch im Zellkulturüberstand zu finden ist, nachdem die Zellen mit Brefeldin A (BFA) und Monensin behandelt wurden. Da BFA und Monensin den vesikulären ER- und Golgi-Transport blockieren, wird IL-1 β demnach über einen ER/Golgi-unabhängigen Weg sezerniert [91]. Walter Nickel hat in seinem 2005 erschienenen Review vier mögliche Wege der ER/Golgi-unabhängigen unkonventionellen Proteinsekretion näher beschrieben, von denen zwei vesikulär und zwei nicht-vesikulär stattfinden [92]. Zu den beiden nicht-vesikulären Wegen gehört zum einen der Export über plasmamembranständige Transporter wie beispielsweise die ABC-Transporter (*ATP binding cassette*), zum anderen das *Blebbing* der Plasmamembran, d. h. das Abschnüren von Exovesikeln. Die beiden vesikulären Wege sind zum einen der Export der zu sezernierenden Proteine über sekretorische Lysosomen, zum anderen der Export über Exosomen, die sich aus multivesikulären Körperchen bilden.

Neben der ER/Golgi-unabhängigen unkonventionellen Sekretion, die für Proteine beschrieben wurde, die über kein N-terminales Signalpeptid verfügen, besteht auch für Proteine mit Signalpeptid die Möglichkeit einer unkonventionellen Sekretion. Es wurden bisher mehrere mögliche Wege einer Golgi-unabhängigen Sekretion beschrieben. Zum einen können die ins ER translozierten Proteine in COPII-Vesikel verpackt werden, die anschließend entweder direkt zur Plasmamembran wandern und

dort mit dieser verschmelzen oder zunächst mit dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment fusionieren und dann zur Plasmamembran wandern. Zum anderen können die zu sezernierenden Proteine in ER-Vesikel ohne COPII verpackt werden. Diese Vesikel sind ebenfalls in der Lage Golgi-unabhängig zur Plasmamembran zu wandern und dort mit dieser zu fusionieren [93]. Die Tatsache, dass TXNDC16 im Vergleich zu SP-TXNDC16-GFP zusätzlich zur Co-Lokalisation mit dem ER-luminalen Protein PDI keine Lokalisation im Golgi-Apparat besitzt, lässt eine Golgi-unabhängige Sekretion von TXNDC16 vermuten.

Die Frage nach der Art der Sekretion von TXNDC16 kann bisher nicht genau beantwortet werden. Allerdings identifizierten Gonzalez-Begn  *et al.* TXNDC16 mittels proteomischer Analysen in Exosomen, die von humanen Ohrspeicheldr senzellen sezerniert wurden [55]. Exosomen sind ca. 40 - 100 nm große Membranvesikel, sogenannte intraluminale Vesikel, die durch Membraneinst lpungen multivesikul rer Endosomen (MVE) entstehen und werden durch Verschmelzung der MVE mit der Plasmamembran sezerniert [94]. Exosomen wurden bisher in diversen menschlichen Körperflüssigkeiten, wie z. B. Blut und Urin gefunden, und können entweder elektronenmikroskopisch auf Grund ihrer Morphologie oder immunologisch auf Grund der Anreicherung bestimmter Membranproteine, sogenannter Tetraspanine (u. a. CD63) identifiziert werden [95-99]. Zu den Proteinen, die wegen eines fehlenden N-terminalen Signalpeptids über einen unkonventionellen ER/Golgi-unabhängigen Weg sezerniert werden, gehört beispielsweise das humane Thioredoxin (TRX). Man ging lange davon aus, dass die Sekretion von TRX über einen nicht-vesikulären Export geschieht, da TRX in keinem membranumschlossenen Kompartiment von sezernierenden Zellen nachgewiesen werden konnte [100]. Jüngste Ergebnisse zeigten jedoch, dass TRX in Exosomen von B-Lymphozyten, von Blasen- und Kolorektal-Karzinomen sowie in Exosomen im Urin detektiert wurde [101-104]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich TXNDC16 in Exosomen befindet, die von HEK293-Zellen ins Zellkulturmedium entlassen wurden. Mittels Ultrazentrifugation wurden die Exosomen aus dem Zellkulturüberstand isoliert und anschließend im Western Blot auf Vorhandensein von TXNDC16 untersucht. Die sezernierten Exosomen der HEK293-Zellen enthielten kein TXNDC16, wohl aber der Exosomen-freie Zellkulturüberstand (siehe Abbildung 13, Kapitel 4.1.8). Somit scheint TXNDC16 zumindest bei HEK293-Zellen nicht den unkonventionellen Weg über die exosomale Sekretion zu durchlaufen. Generell scheint es nicht direkt möglich zu sein, anhand der

exosomalen Lokalisation sagen zu können, welchen sekretorischen Weg ein Protein durchläuft. So konnte in derselben Arbeit von Gonzales-Begn  *et al.* das ebenfalls zur Protein-Disulfid-Familie gehörende ER-luminale Protein TXNDC5 in den Exosomen der Ohrspeicheldrüse detektiert werden [55]. TXNDC5 verfügt über ein N-terminales Signalpeptid sowie über das klassische ER-Retentionssignal KDEL. In einer unmittelbar anschließenden Arbeit von Graner *et al.* wurde PDI in Exosomen höhergradiger Gliomen nachgewiesen [105]. Dies zeigt, dass nicht nur zytosolische Proteine über einen exosomalen Weg die Zellen verlassen, sondern auch ER-residente Proteine über Exosomen sezerniert werden können.

Sehr wahrscheinlich existieren für TXNDC16 mehrere Sekretionswege, die womöglich Zelltyp-spezifisch durchlaufen werden. Ein Protein bei dem zwei unterschiedliche Sekretionswege bekannt sind, ist Proprotein-Konvertase 7 (PC7). PC7 ist eine von neun sekretorischen Proprotein-Konvertasen des Menschen, zu denen u. a. auch Furin gehört. Sie schneiden typischerweise Proteinvorl ufer unmittelbar nach einem bestimmten Aminosäuremotiv, bestehend aus zwei Lysinen oder Argininen, die entweder zwei oder vier Aminosäuren flankieren [106]. Rousselet *et al.* konnten für PC7 zeigen, dass dieses Protein sowohl über den konventionellen ER/Golgi-abhängigen Weg die Plasmamembran erreicht als auch über einen Golgi-unabhängigen sekretorischen Weg mittels Vesikeln, die kein COPII tragen [107]. Ein weiteres Protein mit mehreren sekretorischen Wegen ist das Enzym Lysylhydroxylase 3 (LH3), dass neben seiner typischerweise ER-luminalen Lokalisation auch funktionell extrazellulär im Gewebe, im Serum und auf der Zelloberfläche kultivierter Zellen nachgewiesen werden konnte [108-110]. Wang *et al.* inkubierten humane Fibrosarkom-Zellen mit BFA und stellten fest, dass die Sezernierung von LH3 ins Zellkulturmedium mit BFA unterbunden wurde, somit also ER/Golgi-abhängig verläuft, während die Sezernierung der plasmamembran-assoziierten Population von LH3 nicht beeinflusst wurde, welche somit ER/Golgi-unabhängig verläuft [111].

Für die Interpretation des sekretorischen Verhaltens von TXNDC16 ist ebenso Lysylhydroxylase 1 (LH1), die wie LH3 eine Lysylhydroxylase-Aktivität besitzt, von Interesse. Obwohl LH1 über keine klassische ER-Retentionssequenz verfügt, konnte dennoch eine ER-Retention nachgewiesen werden [112]. Kellokumpu *et al.* zeigten zuvor schon, dass LH1 mit der ER-Membran assoziiert, wobei laut Suokas *et al.* ein ca.

32 Aminosäuren großes C-terminales Peptid durch Ausbildung einer Schleifenstruktur innerhalb der eisenbindenden Domäne an dieser Assoziation beteiligt ist [113,114]. Suokas *et al.* konnten somit einen Retentionsmechanismus identifizieren, der unabhängig zur klassischen Retention, welche über eine C-terminale Konsensussequenz reguliert wird, erfolgt. Die klassische Retention erfolgt zunächst über die Erkennungen der vier letzten C-terminalen Aminosäuren, die eine Variation der Konsensussequenz KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) darstellen, an einem spezifischen ER-membranständigen KDEL-Rezeptor im *cis*-Golgi. Beim Menschen sind insgesamt drei KDEL-Rezeptoren bekannt (ERD21, ERD22 & ERD23), die homolog zu dem Hefe-spezifischen HDEL-Rezeptor ERD2 sind [115-118]. Im *cis*-Golgi kommt es zu einer Konformationsänderung des KDEL-Rezeptors nach Ligandenbindung und einem anschließenden retrograden COPI-Vesikel-vermittelten Transport vom Golgi zurück ins ER [119,120]. Die Bindung des Liganden wird durch den im Golgi-Apparat vorherrschenden sauren pH-Werts begünstigt [121]. Nachdem die COPI-Vesikel mit der ER-Membran fusionieren, können die gebundenen Proteine sich auf Grund des neutralen pH-Werts im ER vom KDEL-Rezeptor lösen. Das Aminosäuremotiv KDEL ist dabei nicht nur allein für eine Retention eines ER-luminalen Proteins essentiell. Eine Vielzahl an Aminosäuresequenzen sind bisher bekannt, die für eine Retention verantwortlich sein können [118]. Darüber hinaus stellten Alanen *et al.* fest, dass nicht nur alleine die letzten vier Aminosäuren essentiell für eine Retention des Proteins im ER sind, sondern, dass die Aminosäurepositionen -5 und -6 unmittelbar davor einen wichtigen Einfluss auf die Erkennung des Retentionssignals durch die KDEL-Rezeptoren besitzen. Sie konnten beispielsweise zeigen, dass durch Anfügen der beiden Aminosäuren HA (His-Ala) bzw. HL (His-Leu) an das Retentions-ineffiziente Aminosäuremotiv EDEL das untersuchte Reporterprotein in vergleichbarer Weise im ER zurückgehalten wird, wie mit dem klassischen Motiv KDEL [122]. Eine weitere Variante des KDEL-Motivs, welches ebenfalls bei getesteten Reporterproteinen zu einer effizienten Retention führte ist DKEL (Asp-Lys-Glu-Leu) [52,118]. TXNDC16 verfügt ebenfalls über dieses Retentionsmotiv an seinem C-Terminus, jedoch gefolgt von sechs weiteren Aminosäuren, sodass DKEL nicht direkt am C-Terminus lokalisiert ist. Munro und Pelham untersuchten in ihrer Arbeit, ob das zum menschlichen Protein GRP78 (BIP, HSPA5) homologe Protein Grp78 der Ratte, welches wildtypisch über das klassische Retentionssignal KDEL verfügt, ein verändertes Retentionsverhalten zeigt, sobald dieses Motiv um zwei weitere Aminosäuren (in diesem Fall Gly-Leu) verlängert wird. Dabei stellten sie fest, dass nach Expression in COS-Zellen sowohl

das um zwei Aminosäuren verlängerte als auch mehrere der untersuchten C-terminalen Deletionsmutationen von Grp78 mit der gleichen Effizienz ins Zellkulturmedium sezerniert werden und somit die KDEL-Sequenz, welche nicht endständig am C-Terminus vorliegt, keine ER-Retention mehr vermittelt [115].

Obwohl Riemer *et al.* TXNDC16 nach Überexpression in COS-Zellen im Zellkulturmedium nachweisen konnten, konnten sie abschließend jedoch keine genaue Aussage machen, ob es sich dabei um ein Artefakt handelt oder ob TXNDC16 doch den sekretorischen Weg durchläuft [56]. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunodetektion gezeigt werden, dass wildtypisches TXNDC16 bei allen verwendeten Zelllinien, darunter HEK293, HeLa und verschiedene Meningeomzelllinien, im Zellkulturüberstand vorhanden war (siehe Abbildung 7, Kapitel 4.1.4). Sekretionsuntersuchungen einer Deletionsmutante von TXNDC16 mit C-terminalem DKEL ohne weitere Aminosäuren zeigten in HEK293-Zellen stattdessen, dass das Protein im Vergleich zu TXNDC16 mit wildtypischem C-Terminus nicht mehr im Zellkulturmedium nachweisbar war, dafür jedoch verstärkt intrazellulär (siehe Abbildung 8, Kapitel 4.1.5). Die Ergebnisse konnten mit entsprechenden GFP-Konstrukten validiert werden. Es zeigte sich, dass sekretorisches GFP, also GFP welches auf Grund des N-terminalen Signalpeptids von TXNDC16 ins ER transloziert wird, mit den zehn C-terminalen Aminosäuren von TXNDC16 ergänzt (SP-TX-GFP-TX-Cterm) gleichstark sezerniert wird wie sekretorisches GFP mit wildtypischen C-Terminus (SP-TXNDC16-GFP) (siehe Abbildung 9, Kapitel 4.1.5). Im Vergleich dazu wurde sekretorisches GFP mit C-terminalem DKEL (SP-TX-GFP-DKEL) zurückgehalten und war nun intrazellulär nachweisbar. SP-TX-GFP-DKEL war, wenn auch vergleichbar gering, extrazellulär vorhanden, jedoch könnte hier eine Übersättigung der KDEL-Rezeptoren der Grund für eine artifizielle Sezernierung des Proteins gewesen sein [123,124].

TXNDC16 zeigt somit neben einer zytosolischen ER-Assoziation bei den in der Arbeit verwendeten Zelllinien ein sekretorisches Verhalten, welches auf Grund von Retentionsversuchen mit dem endständigen Retentionssignal DKEL in HEK293-Zellen nicht als Artefakt, sondern als physiologische Sezernierung des Proteins gezeigt werden konnte.

5.4 Funktionalität von TXNDC16

Es stellt sich nun die Frage, welche Bedeutung ein sekretorisches Verhalten von TXNDC16 für die Zelle haben kann. Eine biologische Funktion von TXNDC16 konnte bisher nicht gezeigt werden, jedoch wird TXNDC16 auf Grund seiner zentral im Protein lokalisierten Thioredoxin-(TRX)-Domäne der Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDI) zugeordnet. BLAST-Analysen ergaben, dass diese Domäne eine Homologie zu Proteinen der PDI-Familie aufweist, darunter TXNDC5 (HCC-2), einem ER-luminalen Protein, für das Nissom *et al.* eine TRX-Aktivität experimentell ermitteln konnten [125]. Die TXNDC16-TRX-Domäne verfügt zwar nicht wie PDI oder TRX über ein klassisches CXXC-(Cys-X-X-Cys)-Motiv jedoch über ein CX₆C-Motiv. Riemer *et al.* zeigten *in vitro*, dass die beiden Cysteine des CX₆C-Motivs eine Disulfid-Brücke bilden, vergleichbar mit Redox-Proteinen, die eine zu TRX homologe Domäne besitzen [56]. Eine TRX-Aktivität ist somit für TXNDC16 durchaus denkbar.

Untermauert wird ein möglicher Zusammenhang zwischen der Sezernierung von TXNDC16 und einer putativen Redox-Aktivität auf Grund des extrazellulären Nachweises von TRX, dessen Sezernierung durch normale und neoplastische Zellen gezeigt werden konnte [100]. Proteine des Redox-Systems spielen u. a. eine essenzielle Rolle beim Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS), die sowohl exogen, als auch durch natürliche Stoffwechselprozesse oder bei der Ausbildung und Katalyse intrazellulärer Disulfid-Brückenbindungen bei der Faltung von Proteinen gebildet werden [126]. Obwohl für einige ROS bereits gezeigt wurde, dass TRX als direkter Radikalfänger agieren kann, werden als Interaktionspartner für das Protein jedoch hauptsächlich Enzyme beschrieben, die durch TRX reduziert werden, so z. B. Proteine der Peroxiredoxin-Familie [127,128]. In der Tumorbilogie besitzt TRX viele wichtige Funktionen, nicht zuletzt auch eine nachweislich schützende Funktion vor oxidativem Stress, welcher durch eine Vielzahl von karzinogenen Substanzen ausgelöst wird [129,130]. Dennoch wird TRX eine Rolle auch in der Tumorentwicklung zugesprochen. So wurde beschrieben, dass das Protein bei T-Zell-Leukämie als autokriner Wachstumsfaktor wirkt und die Proliferation in neoplastischen T- und B-Lymphozyten induziert [131-133]. Darüber hinaus konnte auf Grund der Überexpression von TRX und der damit verbundenen Inhibierung von ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) eine antiapoptotische Funktion nachgewiesen werden [134]. Mittlerweile ist auch bekannt, dass ein erhöhter Level von TRX bei einigen Tumoren

und Tumorzelllinien zu einer Resistenz gegenüber gängigen Chemotherapeutika führen kann. So wurde in *in vitro* Untersuchungen eine erhöhte Expression von TRX in humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien gezeigt, die resistent gegenüber *cis*-Diamindichloroplatinum (Cisplatin) waren, aber auch *in vivo* bei Brustkrebspatientinnen, deren Tumore Resistenzen gegenüber dem Chemotherapeutikum Docetaxel auswiesen. Des Weiteren wird über den Einfluss des sezernierten TRX bei der Umgehung einer Immunantwort durch Tumore spekuliert. Es wird vermutet, dass TRX Cystin reduziert, welches im extrazellulären Raum die oxidierte Form zweier Cysteine darstellt. T-Lymphozyten besitzen keine Cystin-Transporter und sind daher auf antigenpräsentierende Zellen (APC) angewiesen, die Cystin aufnehmen, zu Cystein reduzieren und den T-Lymphozyten somit zur Verfügung stellen. Zusätzlich hängen die für die Aktivierung der T-Lymphozyten nötigen co-stimulierenden Signale der APC von Cysteinen im extrazellulären Raum ab. Tumore könnten daher in ihrer Umgebung durch Überexpression und Sezernierung von TRX die T-Lymphozyten durch Reduzierung von Cystin zu Cystein und anschließender Aufnahme in die Tumorzellen aushungern und deren Aktivierung unterbinden [135].

Sequenzanalysen von TXNDC16 ergaben, dass innerhalb der TRX-Domäne ein SXXC-Motiv lokalisiert ist, welches interessanterweise Bestandteil des CX₆X-Motivs ist (siehe Abbildung 21). SXXC, ein Sequenzmotiv, welches zuvor nur in Thioredoxin-Proteinen von Bakterien identifiziert wurde, konnte 2003 zum ersten Mal bei PDILT (*protein disulfid isomerase-like protein of the testis*), einem eukaryotischen ER-Protein, identifiziert werden. SXXC befindet sich in diesem Protein innerhalb der TRX-Domäne [136,137]. Bei Zellysaten, welche unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, konnte im anschließenden Western Blot mit PDILT-spezifischem Antikörper gezeigt werden, dass neben der zu erwartenden Bande eine weitere Bande mit höherem Molekulargewicht auftaucht, die unter reduzierenden Bedingungen nicht vorhanden ist. Dieses Ergebnis wurde von van Lyth *et al.* so interpretiert, dass PDILT möglicherweise mithilfe des Cysteins des SXXC-Motivs disulfidabhängige intermolekulare Bindungen mit anderen Proteinen eingehen kann und postulierten für PDILT eine mögliche Chaperon- oder substratspezifische Funktion.

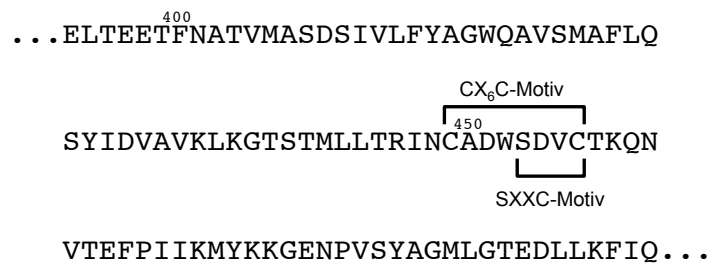


Abbildung 21: Thioredoxin-(TRX)-Domäne von TXNDC16 mit den Sequenzmotiven CX₆C und SXXC. Innerhalb der TRX-Domäne ist zu erkennen, dass SXXC Teil des CX₆X-Motivs ist, dessen Cysteine *in vitro* eine Disulfid-Brückenbindung eingehen.

Auch wenn TXNDC16 eine TRX-Domäne besitzt, die womöglich auch *in vivo* eine TRX-Aktivität besitzt bzw. proteinbindend sein könnte, kann man über eine mögliche Funktion des Proteins lediglich spekulieren. Dabei lohnt sich ein Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen unterschiedlicher TXNDC16-Orthologen von Säugern, wie den Primaten (*Pan troglodytes*, *Pongo abelii*, *Nomascus leucogenys*, *Saimiri boliviensis*, *Macaca mulatta*, *Callithrix jacchus*) oder der Maus (*Mus musculus*), die an ihrem C-Terminus endständig das funktionale Retentionssignal DKEL besitzen (siehe Abbildung 22) [52,122]. Dabei scheint ein einzelner Basenaustausch des ersten Nukleotids des Stop-Codons TGA von Thymin zu Guanin der Grund zusätzlicher Aminosäuren beim humanen TXNDC16 im Vergleich zu seinen Orthologen zu sein, der evolutionär womöglich erst spät aufgetreten ist. Für die endständigen C-terminalen Sequenzmotive von TXNDC16 in anderen höheren Eukaryoten, so beispielsweise beim Huhn (*Gallus gallus*) das Sequenzmotiv HSEL bzw. HTEL bei Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*), wurde die Retentionsfunktionalität ebenfalls gezeigt. Beim Rind (*Bos taurus*) (NQEL) sowie beim Hund (*Canis familiaris*) (NKEL) und der Katze (*Felis domesticus*) (NKEL) wurden bisher noch keine Funktionalitäten untersucht [118,138]. Die meisten TXNDC16-Orthologen scheinen somit bei den entsprechenden Organismen im ER zurückgehalten und nicht wie humanes TXNDC16 sezerniert zu werden.

Abbildung 22: Nukleotid- und Aminosäurevergleich der TXNDC16-Carboxytermini in ausgewählten eukaryotischen Organismen. (Putative) Retentionssignale sind unterstrichen. Das ER-Retentionssignal DKEL ist bei allen Primaten-Orthologen und beim Maus-Ortholog des humanen TXNDC16-Proteins direkt am C-Terminus lokalisiert. Für das Retentionssignale HTEL bei *Xenopus tropicalis* bzw. HSEL bei *Gallus gallus* konnte zuvor eine Funktion nachgewiesen werden. Für die C-terminalen Aminosäuresequenzen von *Bos taurus* (NQEL) sowie von *Canis familiaris* und *Felis domesticus* (NKEL) ist eine Funktion bisher nicht bekannt (n. b.).

101

werden, jedoch wurden mittlerweile auch bei vielen Vertebraten, aber auch Invertebraten, Selenoproteine identifiziert, zu denen u. a. die Glutathionperoxidase (GPx) gehört [141,142].

Bei der humanen Thioredoxinreduktase (TrxR), die wie TRX im extrazellulären Raum nachgewiesen wurde, handelt es sich ebenfalls um ein Selenoprotein [143]. GPx und TrxR verfügen beide jeweils über ein SeC [144,145], das sich bei GPx zentral im Protein und bei TrxR unmittelbar am C-Terminus befindet. Betrachtet man sich nun die Aminosäuresequenz der humanen TrxR genauer, stellt man fest, dass sich das Stop-Codon TGA stromabwärts zum Cystein kodierenden Codon TGC befindet. Beide Aminosäuren sind somit zentral in der katalytisch relevanten Redox-aktiven Sequenz am C-Terminus von TrxR gelegen und bilden wahrscheinlich eine intramolekulare Disulfid-Brücke aus (siehe Abbildung 23) [146]. Geht man nun davon aus, dass die eukaryotische TXNDC16-mRNA bei Primaten mögliche Sekundärstrukturen enthält, die den SECIS-Elementen ähneln könnten, bestünde die Möglichkeit, dass statt der Termination der Translation ein SeC nach der Retentionssequenz DKEL eingebaut wird und die fünf dann folgenden Aminosäuren (Cys-Ser-Lys-Val-Asp), homolog zu denen im humanen TXNDC16, das Protein verlängern (siehe Abbildungen 22 und 23). Womöglich existieren bei Primaten zwei unterschiedliche Isoformen der TXNDC16-Orthologen, zum einen ein ER-luminales TXNDC16 mit endständiger Retentionssequenz, zum anderen ein um sechs Aminosäuren, inklusive SeC, verlängertes sekretorisches TXNDC16-Selenoprotein. Zusätzlich wäre bei Primaten das SeC, wie bei TrxR, direkt benachbart zu einem Cystein, sodass auch hier eine Ausbildung einer intramolekularen Disulfid-Brücke möglich wäre. Die Vermutung, dass bei Primaten zwei Isoformen der TXNDC16-Orthologen existieren, wird durch Selen-Mangel-Experimente bestärkt. Kommt es zu einem Selen-Mangel, beispielsweise durch Einsatz des zu Selenohydryl-Gruppen affinen Methylquecksilbers (MeHg), bietet das C-terminale Stop-Codon TGA einen Vorteil gegenüber des TGA-Codons innerhalb des Leserahmens [147]. TGA-Codons in der mRNA von Nicht-Selenoproteinen in eukaryotischen Zellen vermitteln eine Nonsense-Mutation, die zu einer Unterbrechung des Leserahmens führt und somit die Translation eines funktionellen Proteins verhindert. Damit eine Translation von verkürzten Proteinen unterbunden wird, werden mRNAs mit Nonsense-Mutation in eukaryotischen Zellen durch den Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau (*nonsense-mediated mRNA decay - NMD*) degradiert, während C-terminale Stop-Codons von diesem Mechanismus nicht erkannt werden

[148]. Moriarty *et al.* zeigten, dass bei Selen-Mangel, auf Grund des TGA-Stop-Codons innerhalb der kodierenden Sequenz des Selenoproteins Glutathionperoxidase 1 (GPx1), dessen mRNA über NMD degradiert wird [149]. Selen-Mangel-Versuche bei TrxR, welche ein C-terminales TGA-Stop-Codon besitzt, ergaben jedoch, dass dessen mRNA trotz MeHg-Behandlung nicht über NMD abgebaut wird. Es konnte sogar eine Zunahme der mRNA- und der Proteinexpression von TrxR nachgewiesen werden. Dass es sich bei dem exprimierten Protein um die trunkierte Isoform handelt (siehe Abbildung 23), die kein SeC enthält, wurde durch die Abnahme der Redox-Aktivität bestätigt [150,151].

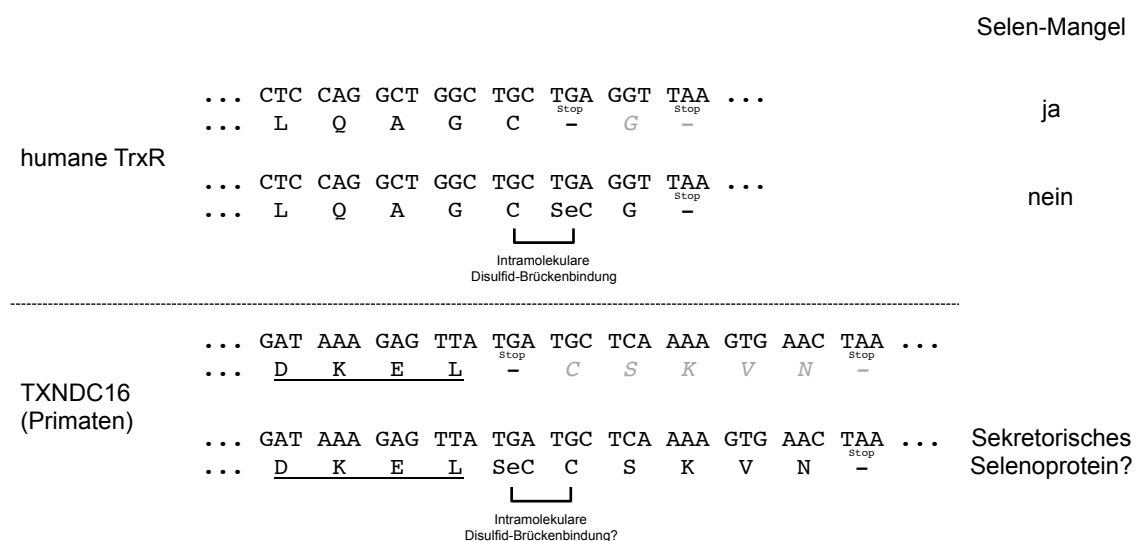


Abbildung 23: Vergleich der Carboxytermini des Selenoproteins TrxR und TXNDC16 bei Primaten. Das humane Selenoprotein TrxR wird bei Selen-Mangel als trunkiertes Protein mit verminderter Redox-Aktivität exprimiert. Der mögliche Einbau von Selenocystein (SeC) in TXNDC16 könnte als theoretische Isoform ein sekretorisches Selenoprotein bewirken. Auf Grund der direkten Nachbarschaft zwischen SeC und Cystein wäre die Ausbildung einer intramolekularen Disulfid-Brückenbindung denkbar.

Abschließend kann gesagt werden, dass TXNDC16, welches in allen Zelltypen exprimiert wird, auf Grund seines N-terminalen Signalpeptids sowohl eine ER-assoziierte zytosolische Lokalisation besitzt als auch über einen möglicherweise ER/Golgi-unabhängigen, nicht-exosomalen Mechanismus ins Zellkulturmedium sezerniert wird. Eine Funktion des Proteins ist nicht bekannt, jedoch sprechen Sequenzanalysen dafür, dass es sich bei TXNDC16 um ein mögliches Thioredoxin-ähnliches Protein mit einer intra- bzw. extrazellulären Redox-Aktivität handelt. Eine Proteinbindung zu ERFAD bzw. weiteren Proteinen wäre über das SXXC-Motiv denkbar. Darüber hinaus könnte TXNDC16 ein früheres Selenoprotein gewesen sein, das auch heute noch in orthologer Form bei Primaten vorkommen könnte.

5.5 Immunogene Epitope von TXNDC16

Die Frage, welche biologischen Funktionen TXNDC16 besitzt, ist und bleibt bisher noch unbeantwortet. Es konnte jedoch im Zuge dieser Arbeit bestätigt werden, dass TXNDC16 bei allen untersuchten Zelllinien im Zellkulturüberstand nachweisbar ist. Interessant ist außerdem, da TXNDC16 als Meningeom-assoziiertes Antigen von Comtesse *et al.* identifiziert wurde, dass gerade bei den verwendeten benignen Meningeomzelllinien Ben-Men-1 und HBL-52, sowie bei der malignen Meningeomzelllinie IOMM-Lee, das Protein im Zellkulturüberstand deutlich stärker vorhanden war als bei HeLa-Zellen. Darüber hinaus lag im Vergleich zu HEK293- und HeLa-Zellen die intrazelluläre Konzentration von TXNDC16 bei den Meningeomzelllinien unter der immunologischen Nachweisgrenze (siehe Abbildung 10, Kapitel 4.1.6).

Die extrazelluläre Lokalisation von TXNDC16 und die Tatsache, dass bei den Meningeompatienten, bei denen Autoantikörper gegen dieses Protein im Serum detektiert werden konnten, eine bis zu dreifach höhere Genexpression von *TXNDC16* nachgewiesen wurde, kann eine Erklärung für dessen Immunogenität sein [4,8,9,18,19]. Daniels *et al.* stellten bei Expressionsuntersuchungen an Prostatakarzinomen beispielsweise fest, dass bei ca. 19 % der untersuchten Seren eine humorale Antwort gegen das sekretorische Protein LEDGF/p75 vorkommt, aber nur in ca. 6 % der Kontrollseren [152]. Obwohl Backes *et al.* berechneten, dass es sich bei den bis dahin bekannten seroreaktiven Antigenen, die in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen stehen, signifikant häufiger um sekretorische und extrazelluläre Proteine handelt, konnte dies bei den bisher bekannten Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) nicht bestätigt werden [153]. Nichtsdestotrotz scheint eine extrazelluläre Lokalisation in Verbindung mit einer Überexpression für die Erkennung durch Autoantikörpern von Vorteil zu sein.

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass nicht nur TAAs als generelle Biomarker für bestimmte Tumorerkrankungen dienen können, sondern auch spezielle Epitope dieser TAAs, an denen hauptsächlich die Bindung von Autoantikörpern stattfindet. Auf Grund genetischer Umlagerung können Antikörper gegen jegliche Art von Epitopen gerichtet sein, die sowohl Peptide als auch Polysaccharide eines Proteins sein können. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Epitopen, das

Konformationsepitop und das lineare Epitop. Bei dem Konformationsepitop handelt es sich um Antikörperbindestellen, die auf Grund der räumlichen Struktur eines Proteins entstehen. Oft werden bei gefalteten Proteinen bestimmte Proteindomänen in räumliche Nähe zueinander gebracht. Das lineare Epitop hingegen ist meist eine zusammenhängende Struktur eines Antigens, beispielsweise eine lineare Peptidsequenz und spielt gerade bei der humoralen Immunantwort eine entscheidende Rolle. So konnte durch Zeng *et al.* zum ersten Mal gezeigt werden, dass für das Protein NY-ESO-1 ein 40 Aminosäuren Proteinfragment repräsentativ genutzt werden kann, um Autoantikörper gegen das Protein in Seren von Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen nachzuweisen [154]. Für ENO1, ein TAA gegen das Autoantikörper in Seren von Patienten mit unterschiedlichsten Erkrankungen nachgewiesen werden konnten, u. a. auch in Seren von Meningeompatienten, sind in den letzten Jahren verschiedene immunogene Epitope identifiziert worden [25]. Autoantikörper in den Seren von Patienten von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen erkannten besonders häufig Epitope im N-terminalen Bereich von ENO1, während die von Autoantikörpern bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis erkannten Epitope vor allem im C-terminalen Bereich von ENO1 lagen [155,156].

Für das Meningeom-assoziierte Antigen TXNDC16 ist es nun zum ersten Mal gelungen, anhand serologischer Untersuchungen ein Set von linearen, immunogenen Epitopen zu bestimmen, mit deren Hilfe sich die Seren von Meningeompatienten mit einer Genauigkeit von 87,2 %, einer Spezifität von 83,7 % und einer Sensitivität von 90,0 % von Normalseren trennen ließen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Berechnungen von Ludwig *et al.*, die anhand eines Sets von mehreren TAAs Meningeomseren von Normalseren mit einer Genauigkeit von 93,84 %, einer Spezifität von 95,62 % und einer Sensitivität von 91,83 % unterscheiden konnten, bietet sich hier eine mögliche, minimal-invasive Alternativmethode des serologischen Nachweises einer putativen Meningeomerkrankung [25]. Zunächst wurde ein Peptidarray hergestellt, auf dessen Nitrozellulosematrix insgesamt 163 Peptide in Duplikaten gespottet wurden, die als 15mer-Peptide mit einer Überlappung von jeweils 10 Aminosäuren das komplette TXNDC16-Protein repräsentieren. Es wurden insgesamt 24 Meningeom- und 19 Normalseren untersucht und die Arrays anschließend bioinformatisch ausgewertet. Bei der Betrachtung der normierten Intensitätswerte fällt auf, dass nicht nur Meningeomseren ein spezifisches Epitopmuster ergaben, sondern auch Normalseren. Es sind somit auch im Serum von

normalen Kontrollprobanden Antikörper vorhanden, die an verschiedenen Peptiden von TXNDC16 binden können. Obwohl Ludwig *et al.* bei ihren Spotassay-Analysen zur Identifizierung serologischer Muster bei Meningeompatienten keine Bindung von Autoantikörpern gegen TXNDC16 in Normalseren feststellen konnten, steht dies nicht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gewonnenen TXNDC16-Peptidmustern der Normalseren. Der Spotassay und der Peptidarray sind zwei unterschiedliche Detektionsplattformen für Antikörper. Während beim Spotassay die im Serum vorhandenen Antikörper auch diskontinuierliche Epitope erkennen können, bietet ein Peptidarray lineare Epitope an, die u. U. bei exprimierten und gefalteten Proteinen auf Grund der räumlichen Struktur für Antikörper nicht zugänglich sind. Antikörper machen einen Großteil der Serumproteine aus, wobei ein erwachsener Mensch einen Antikörpertiter von annähernd 15 mg pro ml Serum besitzt [157]. Daher ist es nicht zu vernachlässigen, dass auch Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen Peptide und Proteine pathogener Organismen mit TXNDC16-Peptiden möglich sind. Da die Größe eines durchschnittlichen Epitops zwischen 8 und 11 Aminosäuren liegt, ist es somit nicht selten, dass bestimmte Aminosäuresequenzen auch in nicht-humanen Proteinen auftreten. BLAST-Analysen der 15mer-Peptid-Sequenzen von TXNDC16 ergaben in einigen Fällen eine lineare, kontinuierliche Sequenzhomologie von bis zu 9 Aminosäuren mit Proteinen von Bakterien und Pilzen, mit denen der Mensch tagtäglich in Berührung kommt und an die sich das Immunsystem bereits adaptiert hat. Ein Beispiel ist das Peptid A12 (PRTSVFLEELNEAVR), bei dem insgesamt 9 Aminosäuren (VFLEELNEA) mit dem Protein Pc14g01460 aus *Penicillium chrysogenum* übereinstimmen. Dabei handelt es sich um eine ubiquitär verbreitete Pilzart, mit denen der Mensch zwangsläufig über Aufnahme von Sporen, sei es oral oder respiratorisch, in Kontakt kommt und sich dadurch Antikörper gegen Proteine aus *P. chrysogenum* bilden können. Darüber hinaus ist es außerdem denkbar, dass sich bei Patienten, die mit Penicillin - einer Gruppe von Antibiotika die aus *P. chrysogenum* gewonnen werden - behandelt wurden, nach Verabreichung des Medikaments eine humorale Immunantwort gegen Proteine bilden können, die trotz der Aufreinigung des Antibiotikums aus Zellkulturüberständen des Pilzes nicht zu 100 % vermeidbar sind. Ein weiteres Beispiel ist das Peptid B12 (VMEAAFVYGTTYQFV) bei dem ebenfalls insgesamt 9 Aminosäuren (EAAFVYGTT) mit der Sulfatadenyltransferase aus *Staphylococcus saprophyticus* übereinstimmen. *S. saprophyticus*, ein grampositives Bakterium, ist neben *E. coli* hauptverantwortlich für

Harnwegsinfektionen und somit ebenfalls fester Bestandteil einer permanenten Konfrontation des menschlichen Immunsystems mit mikrobiellen Organismen [158].

Generell werden Peptidarrays in erster Linie bei der qualitativen Epitoperkennung monoklonaler und polyklonaler Antikörper sowie zur Untersuchung von Proteininteraktion nach Mutationen proteinbindender Domänen verwendet. Bock *et al.* analysierten beispielsweise mehrere kommerziell erhältliche Antikörper gegen mutierte Bereiche der N-terminalen Schwänze der Histone H3, H4, H2A und H2B mit dem von Intavis hergestellten Peptidarrays [159]. Ebenso wurden diese Peptidarrays von Hirano *et al.* zur Erkennung spezifischer Histon H4 Modifikationen durch den Lamin B Rezeptor während der Ausbildung des Heterochromatins benutzt [160].

Für eine exakte Meningeomdiagnose reicht die erzielte Genauigkeit sowie die Richtigpositiv- bzw. Richtignegativrate jedoch nicht aus. Es zeigt sich aber, dass die Identifizierung von immunogenen Epitopen weiterer Meningeom-assoziiierter Antigene zur Erweiterung eines Epitop-Sets und somit eine mögliche Verbesserung der Meningeomvorhersage lohnenswert ist.

5.6 Ausblick

Für TXNDC16 konnte neben einer zytosolischen ER-assoziierten Lokalisation eine Sezernierung gezeigt werden. Die Funktionalität des N-terminalen Signalpeptids für dessen Translokation ins ER wurde anhand einer Deletionsmutante von TXNDC16 und eines GFP-Fusionsproteins konfokalmikroskopisch und mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Wie es zu einer zytosolischen Lokalisation von TXNDC16 kommt, ist bislang unklar. Auf Grund der Interaktion von TXNDC16 mit dem ERAD-assoziierten Proteins ERFAD, wurde eine ERAD-vermittelte retrograde Translokation diskutiert [56]. Die Verwendung von Kifunensin, einem Inhibitor der ER-Mannosidase I und einer daraus resultierenden Unterbindung der ER-vermittelten Retrotranslokation, könnte dies genauer klären [161]. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass ein siRNA-vermittelter Knockdown von Derlin-2 und -3 (*degradation in endoplasmic reticulum protein*) eine Blockierung der ER-assoziierten Degradation falsch gefalteter Glykoproteine bewirkt und demnach ebenso zur Klärung der Retrotranslokation von TXNDC16 beitragen könnte [162].

Signalpeptide besitzen im Gegensatz zu Kernimportsequenzen oder ER-Retentionssignalen keine Konsensussequenz. Es ist jedoch bekannt, dass es Unterschiede in der Effizienz von Signalpeptiden gibt, die u. a. bei CRT gezeigt wurden [163]. Um eine putativ schwache Effizienz des TXNDC16-Signalpeptids als möglichen Grund für eine zytosolische Lokalisation zu untersuchen, könnte das Signalpeptid, wie im Falle des CRTs, durch ein starkes Signalpeptid ausgetauscht werden. Bei CRT wurde dessen Signalpeptid beispielsweise durch das Signalpeptid des sezernierten Proteins Prolaktin ersetzt und die zytosolische Menge des Proteins dadurch deutlich verringert.

TXNDC16 konnte im Überstand der Zelllinien HEK293 und HeLa sowie der Meningeomzelllinien Ben-Men-1, HBL-52 und IOMM-Lee nachgewiesen werden, wobei TXNDC16 bei HEK293-Zellen nicht in Exosomen lokalisiert ist. Die Funktionalität des maskierten Retentionssignals DKEL ist sowohl bei TXNDC16- als auch GFP-Varianten nicht vorhanden. Es bleibt nun zu klären, ob TXNDC16 über den klassischen ER/Golgi-Weg von den Zellen sezerniert wird oder möglicherweise über einen unkonventionellen Sekretionsweg. Eine ER/Golgi-abhängige Sezernierung könnte dabei unter Verwendung von Brefeldin A inhibiert werden [164]. Bisher wurde die Sezernierung

des endogenen TXNDC16 nur bei menschlichen Tumorzelllinien gezeigt. Die Bestätigung der TXNDC16-Sezernierung in humanen nicht-kancerösen Zellen oder Zelllinien steht bisher noch aus.

Die Funktionalität von TXNDC16 ist bis heute nicht bekannt. Obwohl *in vitro* eine intramolekulare Disulfid-Brückenbindung von Cys449 und Cys456 gezeigt wurde, bleibt die Frage weiterhin offen, ob das endogene TXNDC16 eine Redox-Funktion besitzt [56]. Eine Möglichkeit bietet hierbei der Thioredoxin-Assay, bei dem ein Thioredoxin-ähnliches Protein die Spaltung der Disulfid-Brückenbindung unter Verwendung des reduzierenden Moleküls DTT katalysiert [165].

Ob neben ERAD noch weitere Interaktionspartner von TXNDC16 existieren, darunter auf Grund der subzellulären Lokalisation möglicherweise auch zytosolische Proteine, könnte anhand eines Protein Microarrays, der eine Vielzahl an humanen Proteinen enthält, ermittelt werden.

Obwohl die Trennung von Meningeom- und Normalseren anhand von fünf immunogenen Epitopen von TXNDC16 mit einer Genauigkeit von über 87 % relativ gut ist, bedarf es für eine mögliche diagnostische Aussagekraft weiterer Optimierungen dieses serologischen Systems. Dazu zählen u. a. eine Erhöhung der Testseren sowie die Erweiterung des Peptidsets mit zusätzlichen immunogenen Epitopen anderer Tumor-assoziiierter Antigene.

6 Literaturverzeichnis

1. Kleihues P, Burger PC, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, *et al.* WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2007.
2. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5: v1-49
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, *et al.* (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109
4. Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, *et al.* (2005) Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9601-6
5. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, *et al.* (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11810-3
6. Bussow K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, *et al.* (1998) A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res* 26: 5007-8
7. Cancer Immunome Database.
Available at: <http://ludwig-sun5.unil.ch/Cancer-ImmunomeDB/>.
8. Keller A, Ludwig N, Comtesse N, Hildebrandt A, Meese E, *et al.* (2006) A minimally invasive multiple marker approach allows highly efficient detection of meningioma tumors. *BMC Bioinformatics* 7: 539
9. Keller A, Ludwig N, Comtesse N, Henn W, Steudel WI, *et al.* (2008) Combining gene expression signatures and autoantibody profiles in human meningioma. *Gene Ther* 16: 184-9
10. Harz C. Charakterisierung des Meningeom-assoziierte Antigens TXNDC16. Universität des Saarlandes. Uniklinikum Homburg. Institut für Humangenetik. 2009.
11. Barbe L, Lundberg E, Oksvold P, Stenius A, Lewin E, *et al.* (2008) Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome. *Mol Cell Proteomics* 7: 499-508

12. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. 5te ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2002.
13. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, *et al.* (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49: 1374-403
14. Rafter J, Glinghammar B (1998) Interactions between the environment and genes in the colon. *Eur J Cancer Prev* 7 Suppl 2: S69-74
15. de Gruijl FR (1999) Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* 35: 2003-9
16. Somasundaram R, Swoboda R, Caputo L, Otvos L, Weber B, *et al.* (2006) Human leukocyte antigen-A2-restricted CTL responses to mutated BRAF peptides in melanoma patients. *Cancer Res* 66: 3287-93
17. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 615-25
18. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B (1997) Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 18: 267-8
19. Kirmiz C, Li B, An HJ, Clowers BH, Chew HK, *et al.* (2007) A serum glycomics approach to breast cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 6: 43-55
20. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, Jr., Beard JH, Pond HS, *et al.* (1990) Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol* 143: 1146-52; discussion 1152-4
21. Stamey TA, Johnstone IM, McNeal JE, Lu AY, Yemoto CM (2002) Preoperative serum prostate specific antigen levels between 2 and 22 ng./ml. correlate poorly with post-radical prostatectomy cancer morphology: prostate specific antigen cure rates appear constant between 2 and 9 ng./ml. *J Urol* 167: 103-11
22. Cao DL, Yao XD (2010) Advances in biomarkers for the early diagnosis of prostate cancer. *Chin J Cancer* 29: 229-33
23. Curtis J, Bourne FJ (1973) Half-lives of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the serum of new-born pigs. *Immunology* 24: 147-55
24. Eden E, Geva-Zatorsky N, Issaeva I, Cohen A, Dekel E, *et al.* (2011) Proteome half-life dynamics in living human cells. *Science* 331: 764-8
25. Ludwig N, Keller A, Heisel S, Leidinger P, Rheinheimer S, *et al.* (2010) Novel immunogenic antigens increase classification accuracy in meningioma to 93.84%. *Int J Cancer*

26. Leidinger P, Keller A, Heisel S, Ludwig N, Rheinheimer S, *et al.* (2010) Identification of lung cancer with high sensitivity and specificity by blood testing. *Respir Res* 11: 18
27. Ludwig N, Keller A, Comtesse N, Rheinheimer S, Pallasch C, *et al.* (2008) Pattern of serum autoantibodies allows accurate distinction between a tumor and pathologies of the same organ. *Clin Cancer Res* 14: 4767-74
28. Soussi T (2000) p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 60: 1777-88
29. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-16
30. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-6
31. Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-9
32. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97: 695-710
33. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74
34. Puttmann S, Senner V, Braune S, Hillmann B, Exeler R, *et al.* (2005) Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization. *Lab Invest* 85: 1163-71
35. Akat K, Mennel HD, Kremer P, Gassler N, Bleck CK, *et al.* (2003) Molecular characterization of desmosomes in meningiomas and arachnoidal tissue. *Acta Neuropathol* 106: 337-47
36. Lee WH (1990) Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee. *Neurosurgery* 27: 389-95; discussion 396
37. Fulwyler MJ (1965) Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150: 910-1

38. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969) Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166: 747-9
39. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, *et al.* (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-4
40. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, *et al.* (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
41. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
42. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
43. Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151: 369-74
44. Friedenauer S, Berlet HH (1989) Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem* 178: 263-8
45. Layne DS, Common RH, Maw WA, Fraps RM (1957) Presence of progesterone in extracts of ovaries of laying hens. *Proc Soc Exp Biol Med* 94: 528-9
46. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
47. Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-12
48. Pelham HR, Jackson RJ (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67: 247-56
49. Krieg PA, Melton DA (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 7057-70
50. R Development Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2010.
51. Saraogi I, Shan SO (2011) Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic* 12: 535-42

52. Andres DA, Dickerson IM, Dixon JE (1990) Variants of the carboxyl-terminal KDEL sequence direct intracellular retention. *J Biol Chem* 265: 5952-5
53. Tanudji M, Hevi S, Chuck SL (2002) Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. *J Cell Sci* 115: 3849-57
54. Bu G, Rennke S, Geuze HJ (1997) ERD2 proteins mediate ER retention of the HNEL signal of LRP's receptor-associated protein (RAP). *J Cell Sci* 110 (Pt 1): 65-73
55. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, *et al.* (2009) Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* 8: 1304-14
56. Riemer J, Hansen HG, Appenzeller-Herzog C, Johansson L, Ellgaard L (2011) Identification of the PDI-family member ERp90 as an interaction partner of ERFAD. *PLoS One* 6: e17037
57. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-95
58. Rapoport TA, Jungnickel B, Kutay U (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65: 271-303
59. Cross BC, Sinning I, Lührink J, High S (2009) Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 255-64
60. Gorlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75: 615-30
61. Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Gorlich D, Jentsch S, *et al.* (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367: 654-7
62. Prinz A, Behrens C, Rapoport TA, Hartmann E, Kalies KU (2000) Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J* 19: 1900-6
63. Zimmermann R, Blatch GL (2009) A novel twist to protein secretion in eukaryotes. *Trends Parasitol* 25: 147-50
64. Voss NR, Gerstein M, Steitz TA, Moore PB (2006) The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel. *J Mol Biol* 360: 893-906

65. Zimmermann R, Eyrisch S, Ahmad M, Helms V (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808: 912-24
66. Rapoport TA (1985) Extensions of the signal hypothesis--sequential insertion model versus amphipathic tunnel hypothesis. *FEBS Lett* 187: 1-10
67. Kang SW, Rane NS, Kim SJ, Garrison JL, Taunton J, *et al.* (2006) Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* 127: 999-1013
68. Schulman S, Wang B, Li W, Rapoport TA (2010) Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15027-32
69. Yamazaki T, Miyazawa Y, Kobayashi A, Moriwaki T, Fujii N, *et al.* (2012) MIZ1, an essential protein for root hydrotropism, is associated with the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum membrane in Arabidopsis root cells. *FEBS Lett* 586: 398-402
70. Kaji H, Yamauchi Y, Takahashi N, Isobe T (2006) Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. *Nat Protoc* 1: 3019-27
71. Sato Y, Suzuki Y, Ito E, Shimazaki S, Ishida M, *et al.* (2006) Identification and characterization of an increased glycoprotein in aging: age-associated translocation of cathepsin D. *Mech Ageing Dev* 127: 771-8
72. Kaji H, Kamiie J, Kawakami H, Kido K, Yamauchi Y, *et al.* (2007) Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 6: 2100-9
73. Coppelino MG, Woodside MJ, Demarex N, Grinstein S, St-Arnaud R, *et al.* (1997) Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 386: 843-7
74. Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J, *et al.* (2001) Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J Cell Biol* 152: 127-40
75. Holaska JM, Black BE, Rastinejad F, Paschal BM (2002) Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin. *Mol Cell Biol* 22: 6286-97
76. Decca MB, Bosc C, Luche S, Brugiere S, Job D, *et al.* (2006) Protein arginylation in rat brain cytosol: a proteomic analysis. *Neurochem Res* 31: 401-9
77. Decca MB, Carpio MA, Bosc C, Galiano MR, Job D, *et al.* (2007) Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of calreticulin component of stress granules. *J Biol Chem* 282: 8237-45

78. Henle KJ, Kaushal GP, Nagle WA, Nolen GT (1993) Prompt protein glycosylation during acute heat stress. *Exp Cell Res* 207: 245-51
79. Jethmalani SM, Henle KJ, Kaushal GP (1994) Heat shock-induced prompt glycosylation. Identification of P-SG67 as calreticulin. *J Biol Chem* 269: 23603-9
80. Kapron JT, Hilliard GM, Lakins JN, Tenniswood MP, West KA, *et al.* (1997) Identification and characterization of glycosylation sites in human serum clusterin. *Protein Sci* 6: 2120-33
81. Zhang H, Kim JK, Edwards CA, Xu Z, Taichman R, *et al.* (2005) Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol* 7: 909-15
82. Riemer J, Appenzeller-Herzog C, Johansson L, Bodenmiller B, Hartmann-Petersen R, *et al.* (2009) A luminal flavoprotein in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14831-6
83. Bays NW, Gardner RG, Seelig LP, Joazeiro CA, Hampton RY (2001) Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* 3: 24-9
84. Chen B, Mariano J, Tsai YC, Chan AH, Cohen M, *et al.* (2006) The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 341-6
85. Grove DE, Fan CY, Ren HY, Cyr DM (2011) The endoplasmic reticulum-associated Hsp40 DNAJB12 and Hsc70 cooperate to facilitate RMA1 E3-dependent degradation of nascent CFTR Δ F508. *Mol Biol Cell* 22: 301-14
86. Swanson R, Locher M, Hochstrasser M (2001) A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* 15: 2660-74
87. Brodsky JL (2012) Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* 151: 1163-7
88. Hampton RY, Sommer T (2012) Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Curr Opin Cell Biol* 24: 460-6
89. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, *et al.* *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 17.3, Overview of the Secretory Pathway. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21471/>.
90. Liu F, Rong YP, Zeng LC, Zhang X, Han ZG (2003) Isolation and characterization of a novel human thioredoxin-like gene hTLP19 encoding a secretory protein. *Gene* 315: 71-8

91. Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 9: 1503-10
92. Nickel W (2005) Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6: 607-14
93. Nickel W, Rabouille C (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 148-55
94. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200: 373-83
95. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, *et al.* (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-72
96. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, *et al.* (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273: 20121-7
97. Hemler ME (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 397-422
98. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13368-73
99. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C (2005) Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 17: 879-87
100. Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem* 267: 24161-4
101. Choi DS, Lee JM, Park GW, Lim HW, Bang JY, *et al.* (2007) Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res* 6: 4646-55
102. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, *et al.* (2009) Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol* 20: 363-79
103. Buschow SI, van Balkom BW, Aalberts M, Heck AJ, Wauben M, *et al.* (2010) MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunol Cell Biol* 88: 851-6

104. Welton JL, Khanna S, Giles PJ, Brennan P, Brewis IA, *et al.* (2010) Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol Cell Proteomics* 9: 1324-38
105. Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, *et al.* (2009) Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J* 23: 1541-57
106. Seidah NG, Chretien M (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 848: 45-62
107. Rousselet E, Benjannet S, Hamelin J, Canuel M, Seidah NG (2011) The proprotein convertase PC7: unique zymogen activation and trafficking pathways. *J Biol Chem* 286: 2728-38
108. Salo AM, Sipila L, Sormunen R, Ruotsalainen H, Vainio S, *et al.* (2006) The lysyl hydroxylase isoforms are widely expressed during mouse embryogenesis, but obtain tissue- and cell-specific patterns in the adult. *Matrix Biol* 25: 475-83
109. Salo AM, Wang C, Sipila L, Sormunen R, Vapola M, *et al.* (2006) Lysyl hydroxylase 3 (LH3) modifies proteins in the extracellular space, a novel mechanism for matrix remodeling. *J Cell Physiol* 207: 644-53
110. Wang C, Kovanen V, Raudasoja P, Eskelinen S, Pospiech H, *et al.* (2009) The glycosyltransferase activities of lysyl hydroxylase 3 (LH3) in the extracellular space are important for cell growth and viability. *J Cell Mol Med* 13: 508-21
111. Wang C, Ristiluoma MM, Salo AM, Eskelinen S, Myllyla R (2012) Lysyl hydroxylase 3 is secreted from cells by two pathways. *J Cell Physiol* 227: 668-75
112. Suokas M, Myllyla R, Kellokumpu S (2000) A single C-terminal peptide segment mediates both membrane association and localization of lysyl hydroxylase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275: 17863-8
113. Kellokumpu S, Sormunen R, Heikkinen J, Myllyla R (1994) Lysyl hydroxylase, a collagen processing enzyme, exemplifies a novel class of lumenally-oriented peripheral membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 269: 30524-9
114. Suokas M, Lampela O, Juffer AH, Myllyla R, Kellokumpu S (2003) Retrieval-independent localization of lysyl hydroxylase in the endoplasmic reticulum via a peptide fold in its iron-binding domain. *Biochem J* 370: 913-20
115. Munro S, Pelham HR (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907
116. Lewis MJ, Pelham HR (1990) A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348: 162-3

117. Lewis MJ, Pelham HR (1992) Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68: 353-64
118. Raykhel I, Alanen H, Salo K, Jurvansuu J, Nguyen VD, *et al.* (2007) A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* 179: 1193-204
119. Pelham HR (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct Funct* 21: 413-9
120. Orci L, Stannnes M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, *et al.* (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90: 335-49
121. Wu MM, Llopis J, Adams S, McCaffery JM, Kulomaa MS, *et al.* (2000) Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem Biol* 7: 197-209
122. Alanen HI, Raykhel IB, Luukas MJ, Salo KE, Ruddock LW (2011) Beyond KDEL: the role of positions 5 and 6 in determining ER localization. *J Mol Biol* 409: 291-7
123. Dean N, Pelham HR (1990) Recycling of proteins from the Golgi compartment to the ER in yeast. *J Cell Biol* 111: 369-77
124. Monnat J, Neuhaus EM, Pop MS, Ferrari DM, Kramer B, *et al.* (2000) Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a Dictyostelium protein disulfide isomerase. *Mol Biol Cell* 11: 3469-84
125. Nissom PM, Lo SL, Lo JC, Ong PF, Lim JW, *et al.* (2006) Hcc-2, a novel mammalian ER thioredoxin that is differentially expressed in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett* 580: 2216-26
126. Steinbrenner H, Sies H (2009) Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1478-85
127. Das KC, Das CK (2000) Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 443-7
128. Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38: 1543-52
129. Mitsui A, Hirakawa T, Yodoi J (1992) Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1220-6

130. Oblong JE, Berggren M, Gasdaska PY, Powis G (1994) Site-directed mutagenesis of active site cysteines in human thioredoxin produces competitive inhibitors of human thioredoxin reductase and elimination of mitogenic properties of thioredoxin. *J Biol Chem* 269: 11714-20
131. Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, *et al.* (1989) ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J* 8: 757-64
132. Wakasugi N, Tagaya Y, Wakasugi H, Mitsui A, Maeda M, *et al.* (1990) Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8282-6
133. Powis G, Oblong JE, Gasdaska PY, Berggren M, Hill SR, *et al.* (1994) The thioredoxin/thioredoxin reductase redox system and control of cell growth. *Oncol Res* 6: 539-44
134. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, *et al.* (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17: 2596-606
135. Zamanakou M, Germenis AE, Karanikas V (2007) Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett* 111: 69-75
136. Fomenko DE, Gladyshev VN (2003) Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry* 42: 11214-25
137. van Lith M, Hartigan N, Hatch J, Benham AM (2005) PDILT, a divergent testis-specific protein disulfide isomerase with a non-classical SXXC motif that engages in disulfide-dependent interactions in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280: 1376-83
138. Hirate Y, Okamoto H (2006) Canopy1, a novel regulator of FGF signaling around the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish. *Curr Biol* 16: 421-7
139. McCaughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP (1995) Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5431-5
140. Low SC, Berry MJ (1996) Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 21: 203-8
141. Stadtman TC (1996) Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 65: 83-100
142. Jiang L, Ni J, Liu Q (2012) Evolution of selenoproteins in the metazoan. *BMC Genomics* 13: 446

143. Soderberg A, Sahaf B, Rosen A (2000) Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res* 60: 2281-9
144. Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, *et al.* (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J* 5: 1221-7
145. Tamura T, Stadtman TC (1996) A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1006-11
146. Gromer S, Urig S, Becker K (2004) The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev* 24: 40-89
147. Sugiura Y, Tamai Y, Tanaka H (1978) Selenium protection against mercury toxicity: high binding affinity of methylmercury by selenium-containing ligands in comparison with sulfur-containing ligands. *Bioinorg Chem* 9: 167-80
148. Schweingruber C, Rufener SC, Zund D, Yamashita A, Muhlemann O (2013) Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1829: 612-23
149. Moriarty PM, Reddy CC, Maquat LE (1998) Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* 18: 2932-9
150. Lu J, Zhong L, Lonn ME, Burk RF, Hill KE, *et al.* (2009) Penultimate selenocysteine residue replaced by cysteine in thioredoxin reductase from selenium-deficient rat liver. *FASEB J* 23: 2394-402
151. Usuki F, Yamashita A, Fujimura M (2011) Post-transcriptional defects of antioxidant selenoenzymes cause oxidative stress under methylmercury exposure. *J Biol Chem* 286: 6641-9
152. Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, Elliot ML, Yamada B, *et al.* (2005) Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* 62: 14-26
153. Backes C, Ludwig N, Leidinger P, Harz C, Hoffmann J, *et al.* (2011) Immunogenicity of autoantigens. *BMC Genomics* 12: 340
154. Zeng G, Aldridge ME, Wang Y, Pantuck AJ, Wang AY, *et al.* (2005) Dominant B cell epitope from NY-ESO-1 recognized by sera from a wide spectrum of cancer patients: implications as a potential biomarker. *Int J Cancer* 114: 268-73

155. He P, Naka T, Serada S, Fujimoto M, Tanaka T, *et al.* (2007) Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer. *Cancer Sci* 98: 1234-40
156. Goeb V, Thomas-L'Otellier M, Daveau R, Charlionet R, Fardellone P, *et al.* (2009) Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Res Ther* 11: R38
157. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A (2005) Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23: 367-86
158. Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, Kumano M, Morikawa K, *et al.* (2005) Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13272-7
159. Bock I, Dhayalan A, Kudithipudi S, Brandt O, Rathert P, *et al.* (2011) Detailed specificity analysis of antibodies binding to modified histone tails with peptide arrays. *Epigenetics* 6: 256-63
160. Hirano Y, Hizume K, Kimura H, Takeyasu K, Haraguchi T, *et al.* (2012) Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *J Biol Chem* 287: 42654-63
161. Tokunaga F, Brostrom C, Koide T, Arvan P (2000) Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded N-linked glycoproteins is suppressed upon inhibition of ER mannosidase I. *J Biol Chem* 275: 40757-64
162. Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, *et al.* (2006) Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* 172: 383-93
163. Shaffer KL, Sharma A, Snapp EL, Hegde RS (2005) Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function. *Dev Cell* 9: 545-54
164. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988) Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263: 18545-52
165. Holmgren A (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 254: 9627-32

7 Anhang

Tabelle 15: Aminosäuresequenzen der 15mer-Peptide von TXNDC16 (Peptidarray)

Nr.	Peptidsequenz	Nr.	Peptidsequenz	Nr.	Peptidsequenz
A01	MFSGFNVFRVGISFV	B09	IFSYVRAIGIPEHRA	C17	VVFKRAEEGVPVEFL
A02	NVFRVGISFVIMCIF	B10	RAIGIPEHRVMEAA	C18	AEEGVPVEFLVLHDV
A03	GISFVIMCIFYMPTV	B11	PEHRVMEAAFVYGT	C19	PVEFLVLHDVDLIIS
A04	IMCIFYMPTVNSLPE	B12	VMEAAFVYGTTYQFV	C20	VLHDVDLIISHVENN
A05	YMPTVNSLPELSPQK	B13	FVYGTTYQFVLTTEI	C21	DLIISHVENNMHIEE
A06	NSLPELSPQKYFSTL	B14	TYQFVLTTEIALLES	C22	HVENNMHIEEIQEDE
A07	LSPQKYFSTLQPGKA	B15	LTTEIALLESIGSED	C23	MHIEEIQEDEDNDME
A08	YFSTLQPGKASLAYF	B16	ALLESIGSEDVEYAH	C24	IQEDEDNDMEGPDID
A09	QPGKASLAYFCQADS	B17	IGSEDVEYAHLYFFH	D01	DNDMEGPDIDVQDDE
A10	SLAYFCQADSPRTSV	B18	VEYAHLYFFHCKLVL	D02	GPDIDVQDDEVAETV
A11	CQADSPRTSVFLEEL	B19	LYFFHCKLVLDLTQQ	D03	VQDDEVAETVFRDRK
A12	PRTSVFLEELNEAVR	B20	CKLVLDLTQQCRRTL	D04	VAETVFRDRKRKLPL
A13	FLEELNEAVRPLQDY	B21	DLTQQCRRTLMEQPL	D05	FRDRKRKLPLELTVE
A14	NEAVRPLQDYGISVA	B22	CRRTLMEQPLTTLNI	D06	RKLPLELTVELTEET
A15	PLQDYGISVAKVNCV	B23	MEQPLTTLNIHLFIK	D07	ELTVELTEETFNATV
A16	GISVAKVNCVKKEIS	B24	TTLNIHLFIKTMKAP	D08	LTEETFNATVMASDS
A17	KVNCVKKEISRYCGK	C01	HLFIKTMKAPLLTEV	D09	FNATVMASDSIVLFY
A18	KKEISRYCGKEKDLM	C02	TMKAPLLTEVAEDPQ	D10	MASDSIVLFYAGWQA
A19	RYCGKEKDLMKAYLF	C03	LLTEVAEDPQQVSTV	D11	IVLFYAGWQAVSMAF
A20	EKDLMKAYLFKGNIL	C04	AEDPQQVSTVHLQLG	D12	AGWQAVSMAFLQSYI
A21	KAYLFKGNILLREFP	C05	QVSTVHLQLGLPLVF	D13	VSMAFLQSYIDVAVK
A22	KGNILLREFPTDTLF	C06	HLQLGLPLVFIVSQQ	D14	LQSYIDVAVKLKGT
A23	LREFPTDTLFDVNAI	C07	LPLVFIVSQQATYEA	D15	DVAVKLKGTSTMLLT
A24	TDTLFDVNAIVAHVL	C08	IVSQQATYEADRRTA	D16	LKGTSTMLLTRINCA
B01	DVNAIVAHVLFALLF	C09	ATYEADRRTAEWVAW	D17	TMLLTRINCADWSDV
B02	VAHVLFALLFSEVKY	C10	DRRTAEWVAWRLLGK	D18	RINCADWSDVCTKQN
B03	FALLFSEVKYITNLE	C11	EWVAWRLLGKAGVLL	D19	DWSDVCTKQNVTEFP
B04	SEVKYITNLEDLQNI	C12	RLLGKAGVLLLRDS	D20	CTKQNVTEFPPIKMY
B05	ITNLEDLQNIENALK	C13	AGVLLLRDSLEVNI	D21	VTEFPPIKMYKKGEN
B06	DLQNIENALKGKANI	C14	LLRDSLEVNIPODAN	D22	IIKMYKKGENPVSYA
B07	ENALKGKANIIFSYV	C15	LEVNIPODANVVFKR	D23	KKGENPVSYAGMLGT
B08	GKANIIFSYVRAIGI	C16	PODANVVFKRAEEGV	D24	PVSYAGMLGTEDLLK

Fortsetzung Tabelle 15:

Nr.	Peptidsequenz	Nr.	Peptidsequenz	Nr.	Peptidsequenz
E01	GMLGTEDLLKFIQLN	E24	STHAQDIVQIITDAL	F23	IIEENLVLWLKKLEA
E02	EDLLKFIQLNRISYP	F01	DIVQIITDALLEMFP	F24	LVLWLKKLEAGLENH
E03	FIQLNRISYPVNITS	F02	ITDALLEMFPEITVE	G01	KKLEAGLENHITILP
E04	RISYPVNITSIQEAE	F03	LEMFPEITVENLPSY	G02	GLENHITILPAQEWK
E05	VNITSIQEAE EYLSG	F04	EITVENLPSYFRLQK	G03	ITILPAQEWKPPLPA
E06	IQEAE EYLSGELYKD	F05	NLPSYFRLQKPLLLIL	G04	AQEWKPPLPAYDFLS
E07	EYLSGELYKDLILYS	F06	FRLQKPLLLILFSDGT	G05	PPLPAYDFLSMIDAA
E08	ELYKDLILYSSVSVL	F07	PLLLILFSDGT VNPQY	G06	YDFLSMIDAATSQRG
E09	LILYSSVSVLGLFSP	F08	FSDGT VNPQYKKAIL	G07	MIDAATSQRGTRKVP
E10	SVSVLGLFSPTMKTA	F09	VNPQYKKAILTLVKQ	G08	TSQRGTRKVPKCMKE
E11	GLFSPTMKTAKEDFS	F10	KKAILTLVKQKYLDS	G09	TRKVPKCMKETDVQE
E12	TMKTAKEDFSEAGNY	F11	TLVKQKYLDSFTPCW	G10	KCMKETDVQENDKEQ
E13	KEDFSEAGNYLKG YV	F12	KYLDSFTPCWLN LKN	G11	TDVQENDKEQHEDKS
E14	EAGNYLKG YVITGIY	F13	FTPCWLN LKNTPVGR	G12	NDKEQHEDKSAVRKE
E15	LKG YVITGIYSEEDV	F14	LN LKNTPVGRGILRA	G13	HEDKSAVRKEPIETL
E16	ITGIYSEEDV LLLST	F15	TPVGRGILRAYFDPL	G14	AVRKEPIETLRIKHW
E17	SEEDV LLLSTKYAAS	F16	GILRAYFDPLPPLPL	G15	PIETLRIKHWNRSNW
E18	LLLSTKYAASLPALL	F17	YFDPLPPLPLLV LVN	G16	RIKHWNRSNWFKEAE
E19	KYAASLPALLLARHT	F18	PPLPLLV LVNLHSGG	G17	NRSNWFKEAEKSFR
E20	LPALLLARHTEGKIE	F19	LVLVNLHSGGQVFAF	G18	FKEAEKSFRDKELG
E21	LARHTEGKIESIPLA	F20	LHSGGQVFAF PSDQA	G19	KSFRDKELGCSKVN
E22	EGKIESIPLASTHAQ	F21	QVFAF PSDQA IIEEN		
E23	SIPLASTHAQDIVQI	F22	PSDQA IIEENLVLWL		

Tabelle 16: Übersicht über die Zusammenstellung der Peptidarray-Durchgänge

Array-Charge	Durchgang	Serum (1:1.000)	Sekundär-AK ^a (1:1.000)
A	I	H1428-i (1:500)	AK-1
		H1428-ii	
	II	H72	AK-2
		H149	
		H537	
		H1428-iii	
	III	H1102	AK-3 ^b
		H1193	
		H1428-iv	
		N50	
		H1428-v	
	IV	H1428-vi	AK-5 (1:2.000)
	V	H1119	AK-6 (1:5.000)
		H1359	
		H1401	
		H365	
	VI	H386	AK-7
		H767	
		H1003	
		H1093	
		H1129	
		H1213	
		H1239	
		H1395	
		H1408	
		H1410	
	VII	N220	AK-8
		N230	
		N250	
		N260	
		N270	

^a Cy5-conjugated AffiniPure Rabbit- α -Human IgA, IgG, IgM (H + L)^b Cy5-conjugated AffiniPure Rabbit- α -Human IgG (H + L)

Fortsetzung Tabelle 16:

Array-Charge	Durchgang	Serum (1:1.000)	Sekundär-AK ^a (1:1.000)
B	VIII	H50	AK-10
		H1334	
		H1343	
		H1428-vii	
		H1434	
		N9	
		N13	
		N20	
		N31	
		N32	
		N34	
		N36	
	IV	N37	AK-11
		N38	
		N39	
		N40	
		N41	
		N42	

^a Cy5-conjugated AffiniPure Rabbit- α -Human IgA, IgG, IgM (H + L)

Klonierungsstrategien

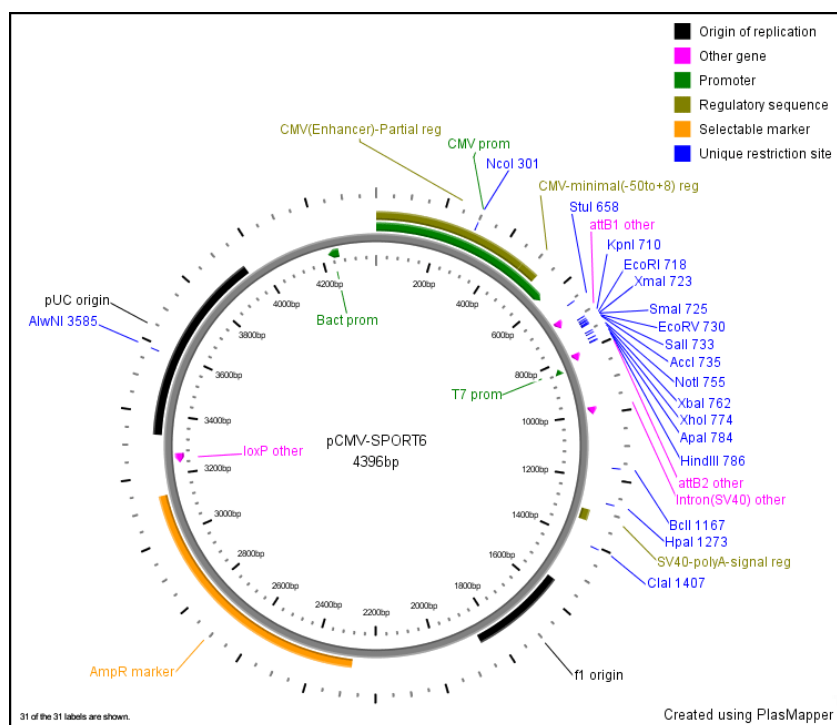
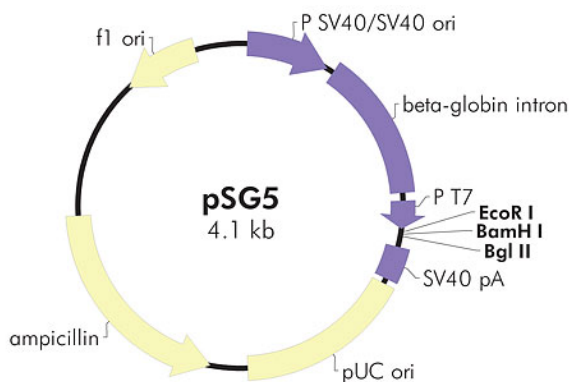


Abbildung 24: Zirkuläre Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pCMV-SPORT6 (Open Biosystems, Thermoscientific, Waltham, USA)



Feature	Nucleotide Position
SV40 promoter and SV40 origin of replication	28–366
β-globin intron	395–967
T7 promoter	1022–1040
EcoR I	1043
BamH I	1049
Bgl II	1055
SV40 polyA signal	1069–1202
pUC origin of replication	1342–2009
ampicillin resistance (bla) ORF	2160–3017
f1 origin of ss-DNA replication	3587–3893

Abbildung 25: Zirkuläre Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pSG5 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

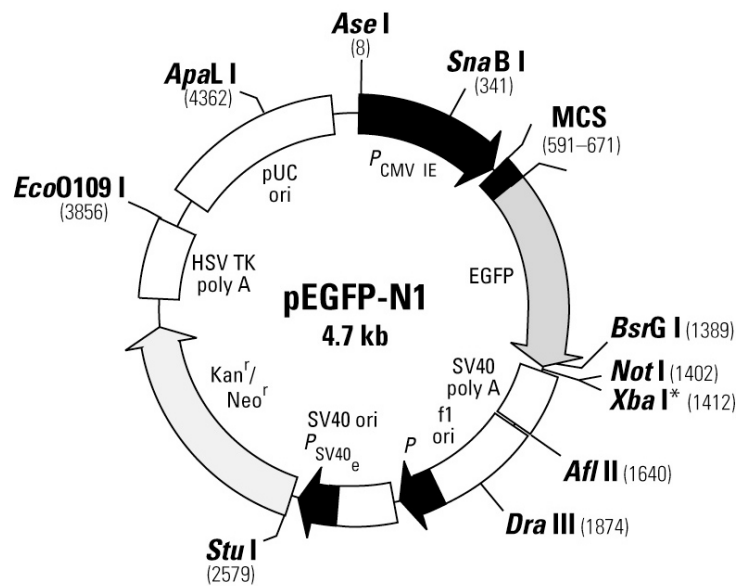


Abbildung 26: Zirkuläre Karte des eukaryotischen Expressionsvektors pEGFP-N1 (www.human.cornell.edu)

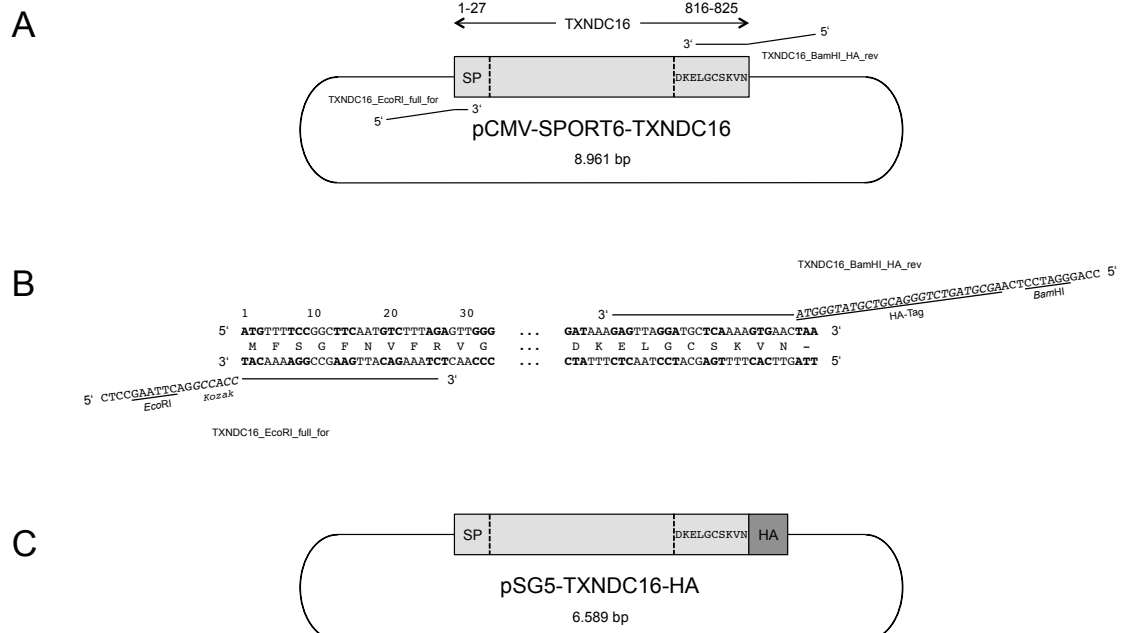


Abbildung 27: Klonierungsstrategie für pSG5-TXNDC16-HA. (A) Template: pCMV-SPORT6-TXNDC16. (B) Primer: TXNDC16_EcoRI_full_for (forward), TXNDC16_BamHI_HA_rev (reverse). (C) Ligation nach Restriktion des PCR-Produkts EcoRI-TXNDC16-HA-BamHI und pSG5 mit EcoRI und BamHI.

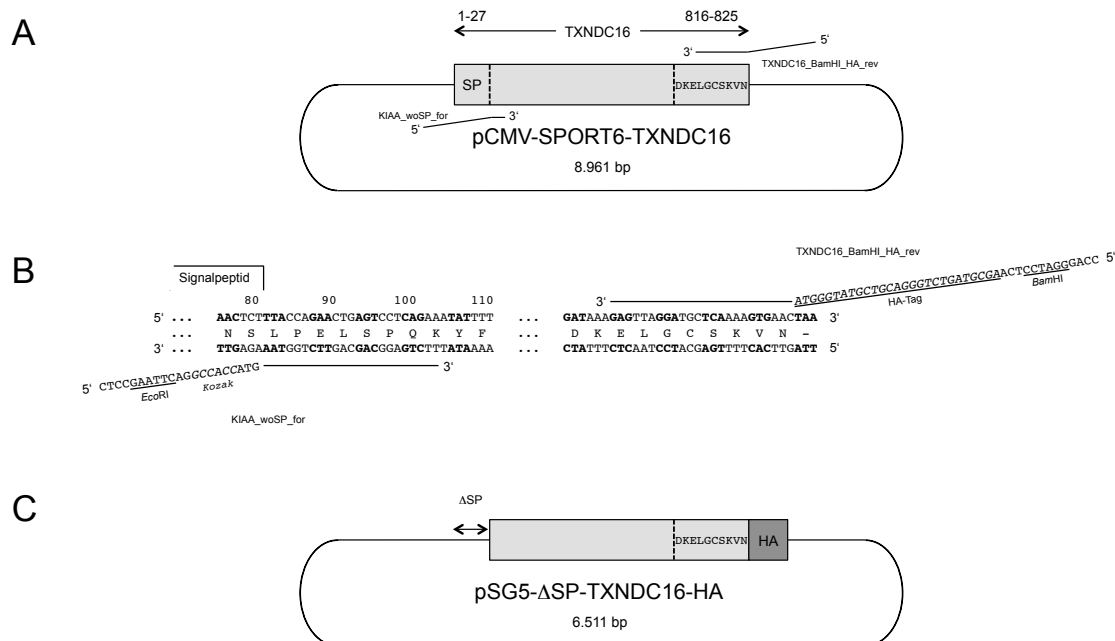


Abbildung 28: Klonierungsstrategie für pSG5-ΔSP-TXNDC16-HA. (A) Template: pCMV-SPORT6-TXNDC16. (B) Primer: KIAA_woSP_for (forward), TXNDC16_BamHI_HA_rev (reverse). (C) Ligation nach Restriktion des PCR-Produkts *EcoRI*-ΔSP-TXNDC16-HA-*BamHI* und pSG5 mit *EcoRI* und *BamHI*.

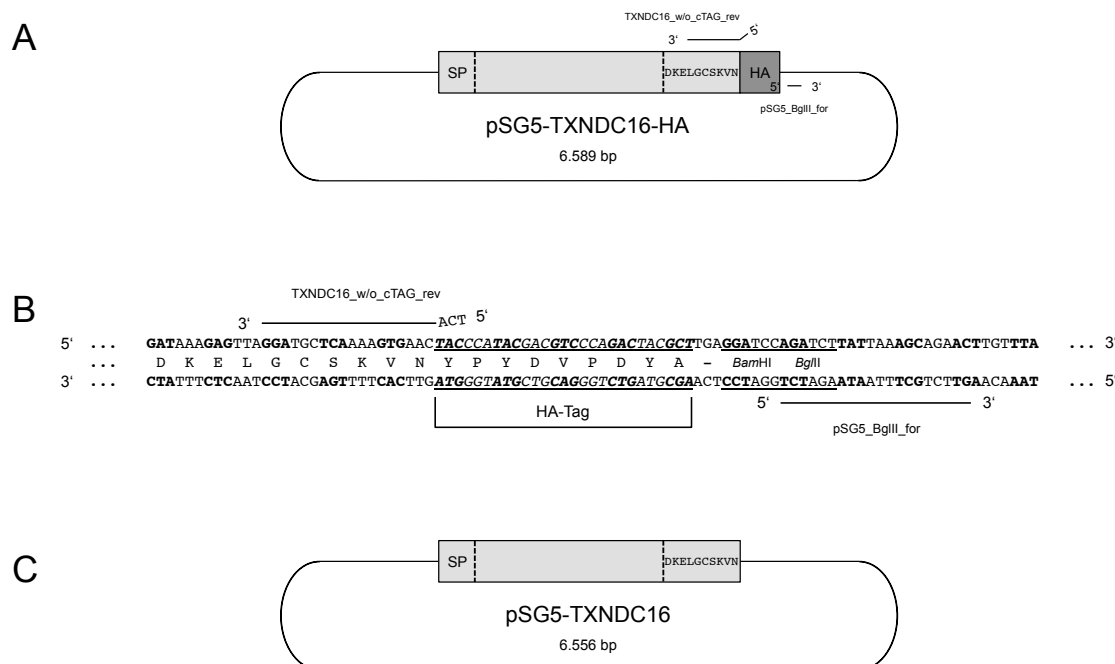


Abbildung 29: Klonierungsstrategie für pSG5-TXNDC16. (A) Template: pSG5-TXNDC16-HA. (B) Primer: pSG5_BglII_for (forward), TXNDC16_w/o_cTAG_rev (reverse). (C) Religation des PCR-Produkts zum zirkulären Plasmid pSG5-TXNDC16.

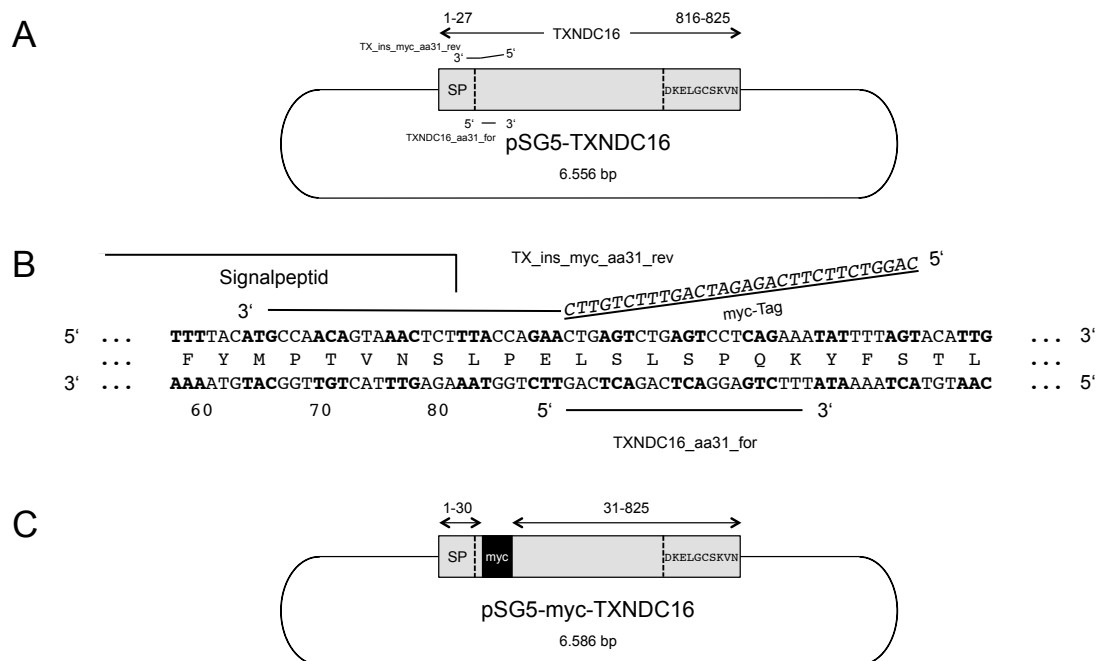


Abbildung 30: Klonierungsstrategie für pSG5-myc-TXNDC16. (A) Template: pSG5-TXNDC16. (B) Primer: TXNDC16_aa31_for (forward), TX_ins_myc_aa31_rev (reverse). (C) Religation des PCR-Produkts zum zirkulären Plasmid pSG5-myc-TXNDC16.

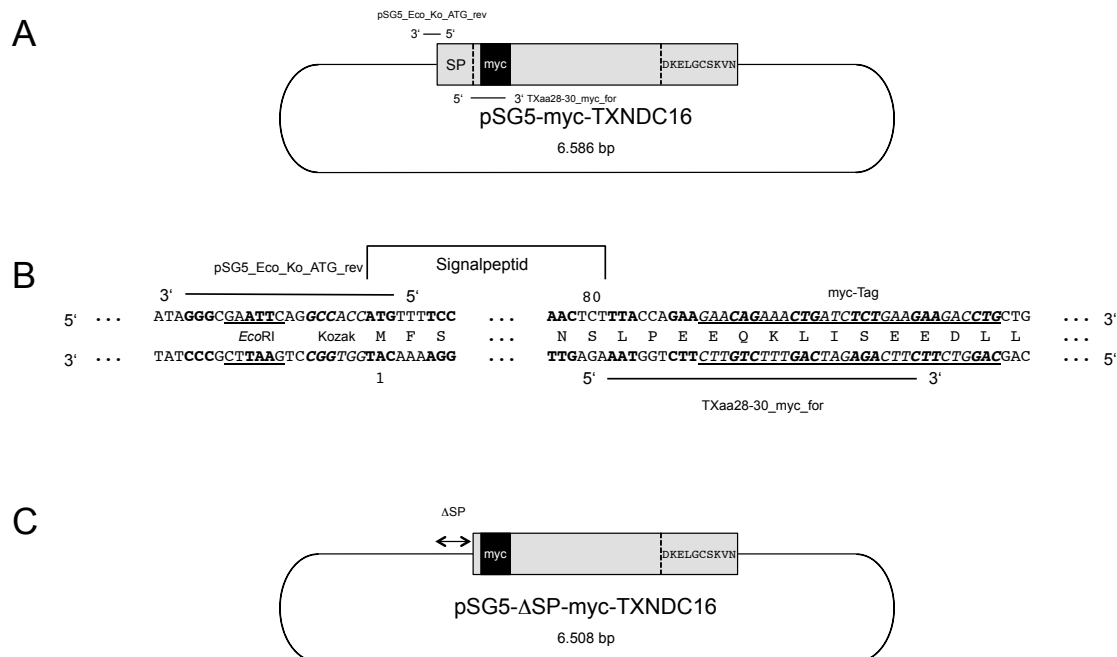


Abbildung 31: Klonierungsstrategie für pSG5-ΔSP-myc-TXNDC16. (A) Template: pSG5-myc-TXNDC16. (B) Primer: TXaa28-30_myc_for (forward), pSG5_Eco_Ko_ATG_rev (reverse). (C) Religation des PCR-Produkts zum zirkulären Plasmid pSG5-ΔSP-myc-TXNDC16.

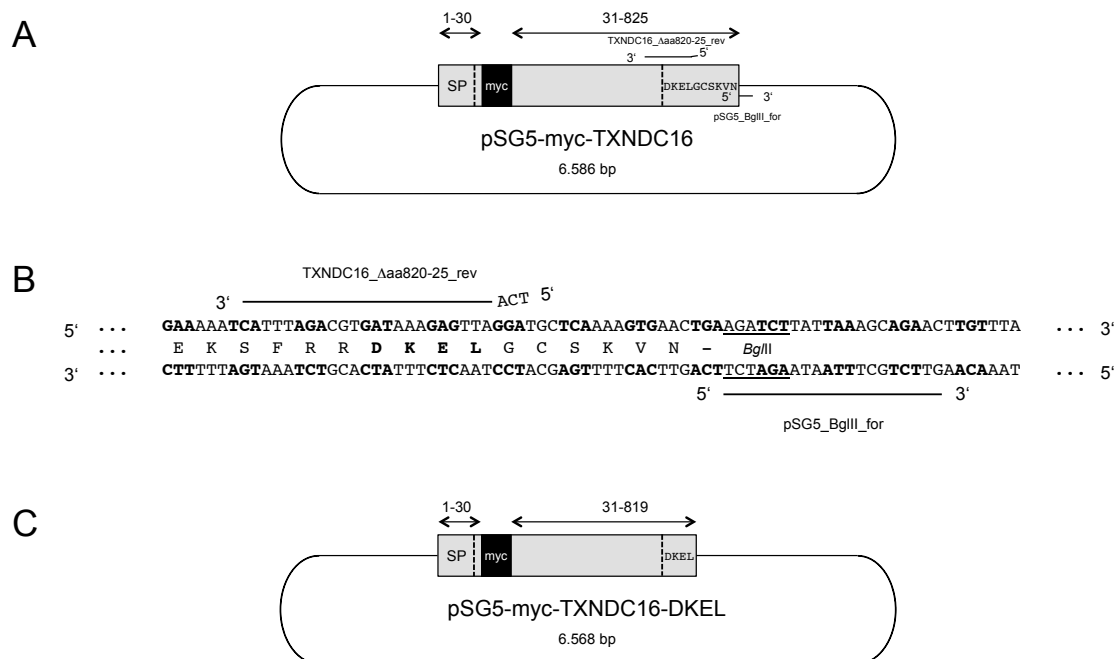


Abbildung 32: Klonierungsstrategie für pSG5-myc-TXNDC16-DKEL. (A) Template: pSG5-myc-TXNDC16. (B) Primer: pSG5_BglII_for (forward), TXNDC16_Aaa820-25_rev (reverse). (C) Religation des PCR-Produkts zum zirkulären Plasmid pSG5-myc-TXNDC16-DKEL.

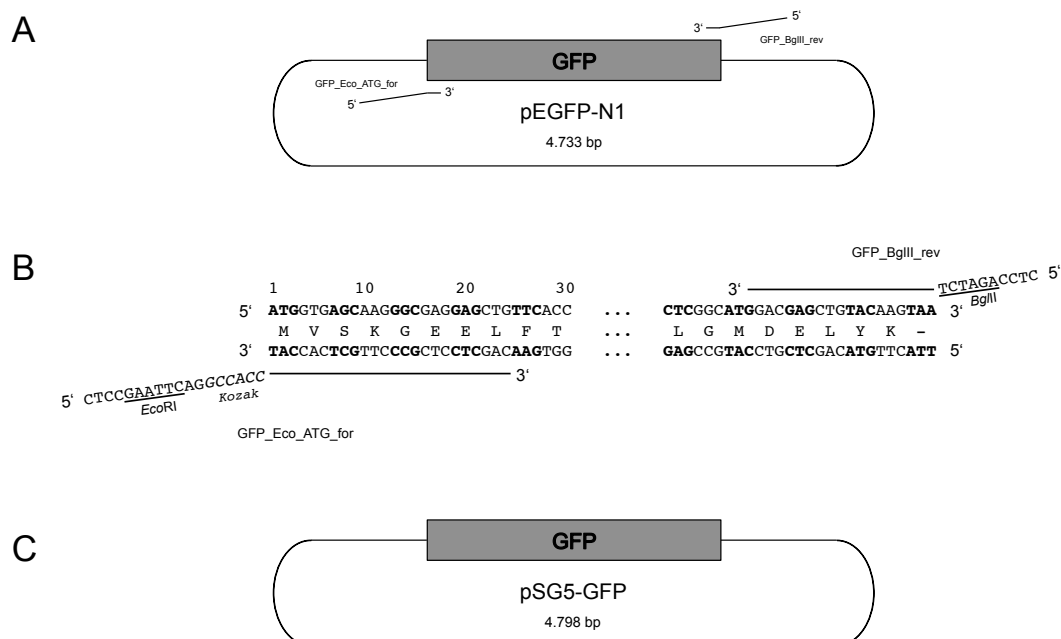


Abbildung 33: Klonierungsstrategie für pSG5-GFP. (A) Template: pEGFP-N1. (B) Primer: GFP_Eco_ATG_for (forward), GFP_BglII_rev (reverse). (C) Ligation nach Restriktion des PCR-Produkts *EcoRI*-GFP-*BglII* und pSG5 mit *EcoRI* und *BglII*.

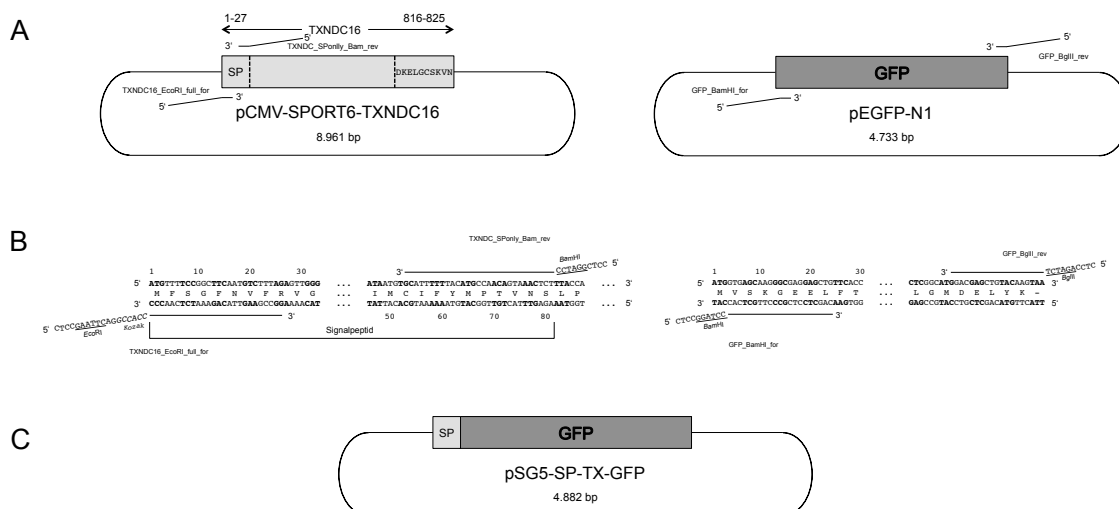


Abbildung 34: Klonierungsstrategie für pSG5-SP-TX-GFP. (A) Templates: pCMV-SPORT6-TXNDC16 und pEGFP-N1. (B) Primer: TXNDC16_EcoRI_full_for (forward) und TXNDC16_Sponly_BamHI_rev (reverse) für *EcoRI*-SP-TX-*Bam*HI bzw. GFP_BamHI_for (forward) und GFP_BglII_rev (reverse) für *Bam*HI-GFP-*Bgl*II. (C) Ligation (von zwei PCR-Produkten und einem linearisierten Vektor) nach Restriktion des PCR-Produkts *EcoRI*-SP-TX-*Bam*HI mit *Eco*RI und *Bam*HI, *Bam*HI-GFP-*Bgl*II mit *Bam*HI und *Bgl*II und pSG5 mit *Eco*RI und *Bgl*II.

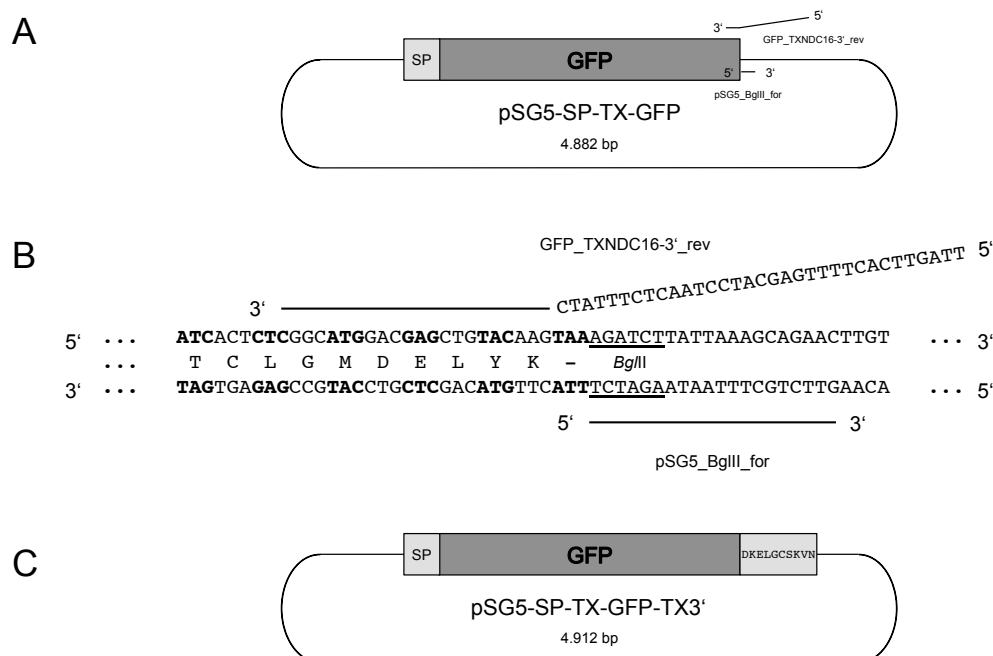


Abbildung 35: Klonierungsstrategie für pSG5-SP-TX-GFP-TX3'. (A) Template: pSG5-SP-TX-GFP. (B) Primer: pSG5_BglII_for (forward), GFP_TXNDC16-3'_rev (reverse). (C) Religation des PCR-Produkts zum zirkulären Plasmid pSG5-SP-TX-GFP-TX3'.

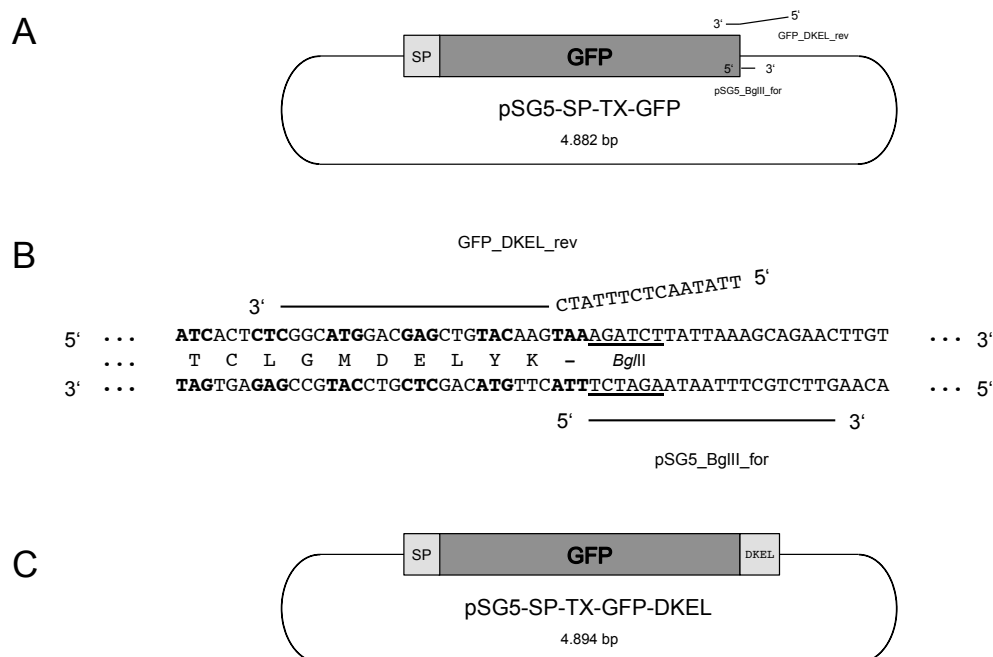


Abbildung 36: Klonierungsstrategie für pSG5-SP-TX-GFP-DKEL. (A) Template: pSG5-SP-TX-GFP. (B) Primer: pSG5_BglIII_for (forward), GFP_DKEL_rev (reverse). (C) Religation des PCR-Produkts zum zirkulären Plasmid pSG5-SP-TX-GFP-DKEL.

Vektorsequenzen

>pCMV-SPORT6-TXNDC16, 8.961 bp, 5'UTR, TXNDC16-cDNA, 3'UTR

```

...cccgggEcoRVatatcAGTCGGTGGCGGCTGCAGGCTGGGAGGGAGAAGTGCTACGCCCTTTCAGGTTGGCGG
AAGTGGTTCCAGGCTACCCGGCTAGTCTGGCACGGCCCCGTCTTCTGCCCTCCTCCGTCGCGTGGCGG
CGGGAAGTGTGGCCGCGCGGCTCGGGAACGGCCAGGTCCCCGCCGCGAGGTCCCGGGCAGATAACAT
AGATCATCAGTAGAAAACTTCTTGAAGTTGTTCAAGAAAAATTTGAAAGTAGCAAAATAGAAAAATAAAGA
ATTAACAGCAGATACAGAGGACAGCATGGAAGTGTGTCTTAGGAAACAGAACACAGCAGTGAAAAACA
GACAAAATCCGCTCAGATACAACCTGCAGCTGATAStartATGTTTCCGGCTTCAATGTCTTTAGAGTTGGGATC
TCTTTTGTCTATAATGTGCATTTTACATGCCAACAGTAAACTCTTTACCAGAACTGAGTCCTCAGAAAT
ATTTTAGTACATTGCAACCAGGAAAAGCCTCTTTAGCTTATTTTGTCAAGCTGATTCCTCAAGAACATC
TGTATTTCTTGAAGAACTGAATGAGGCTGTAGACCTCTGCAGGACTATGGAATTTAGTTGCCAAGGTT
AATTGTGTCAAGAAAGAAATATCAAGATACTGTGGAAGAAAGGATTTGATGAAAGCATATTTATTCA
AGGGCAACATATTGCTCAGAGAATTCCCTACTGACACCTTGTGTGATGTGAATGCCATTGTGCGCCATGT
TCTCTTTGCTCTTCTTTTAGTGAAGTGAAATATATTACCAACCTGGAAGACCTTCAGAACATAGAAAAT
GCTCTGAAAGGAAAAGCAAATATTATATTCTCATATGTAAGAGCCATTGGAATACCAGAGCACAGAGCAG
TCATGGAAGCCGCTTTTGTGTATGGGACTACATACCAATTTGTCTTAACCACAGAAATTGCCCTTTTGGA
AAGTATTGGCTCTGAGGATGTGGAATATGCACATCTCTACTTTTTTTCATTGTAACTAGTCTTGGACTTG
ACCCAGCAATGTAGAAGAACTAATGGAACAGCCATTGACTACACTGAACATTCACCTGTTTATTAAGA
CAATGAAAGCACCTCTGTTGACTGAAGTTGCTGAAGATCCTCAACAAGTTTCAACTGTCCATCTCCAAC
GGGCTTACCACTGGTTTTTATTGTTAGCCAACAGGCTACTTATGAAGCTGATAGAAGAACTGCAGAATGG
GTTGCTTGGCGTCTTCTGGGAAAAGCAGGAGTTCTACTCTTGTAAAGGACTCTTTGGAAGTGAACATTC
CTCAAGATGCTAATGTGGTCTTCAAAAGAGCAGAAGAGGGAGTTCCAGTGAATTTTTGGTATTACATGA
TGTTGATTTAATAATATCTCATGTGGAATAATATGCACATTGAGGAAATACAAGAAGATGAAGACAAT
GACATGGAAGGTCCAGATATAGATGTTTCAGGATGATGAAGTGGCAGAAACTGTTTTTCAGAGATAGGAAGA
GAAAATTACCTTTGGAACCTACAGTGGAACTAACAGAAGAAACATTTAATGCAACAGTGATGGCTTCTGA
CAGCATAGTACTCTTCTATGCTGGTTGGCAAGCAGTATCCATGGCATTTTTGCAATCCTATATTGATGTG
GCAGTTAAACTGAAAGGCACATCTACTATGCTTCTACTAGAAATAAACGTGTCAGATTGGTCTGATGTAT
GTACTAAGCAAAATGTTACTGAATTCCTATCATAAAGATGTACAAGAAAGGCGAGAACCCAGTATCTTA
TGCTGGAATGTTAGGAACCGAAGATCTCTAAAATTTTATCCAGCTCAACAGGATTTTCATATCCAGTGAAT
ATAACATCGATCCAAGAACGAGAAGAAATATTTAAGTGGGGAATTATATAAGACCTCATCTTGTATTCTA

```

GTGTGTCAGTATTGGGACTATTTAGTCCAACCATGAAAACAGCAAAAGAAGATTTTAGTGAAGCAGGAAA
 CTACCTAAAAGGATATGTTATCACTGGAATTTATTCTGAAGAAGATGTTTTGCTACTGTCAACCAAATAT
 GCTGCAAGTCTTCCAGCCCTGCTGCTTGCCAGACACACAGAAGGCAAAATAGAGAGCATCCCCTAGCTA
 GCACACATGCACAAGACATAGTTCAAATAATAACAGATGCACACTGGAATGTTTCCGGAAATCACTGT
 GGAAATCTTCCAGTTATTTTCACTTTCAGAAACCATTATTGATTTTGTTCAGTGATGGCACTGTAAAT
 CCTCAGTATAAAAAAGCAATATTGACACTGGTAAAGCAGAAATACTTGGATTCACTTACTCCATGCTGGT
 TAAATCTAAAGAATACTCCAGTGGGGAGAGGAATCTTGAGGGCATATTTTGATCCTCTGCCTCCCCCTTC
 TCTTCTTGTGTTTGGTGAATCTGCATTCAGGTGGCCAAGTATTTGCATTTCCCTTCAGACCAGGCTATAATT
 GAAGAAAACCTTGATTTGTGGCTGAAGAAATTAGAAGCAGGACTAGAAAATCATATCACAAATTTTACCTG
 CTCAAGAATGGAAACCTCCTCTTCCAGCTTATGATTTTCTAAGTATGATAGATGCCGCAACATCTCAACG
 TGGCACTAGGAAAAGTTCCCAAGTGATGAAAGAAACAGATGTGCAGGAGAATGATAAGGAACAACATGAA
 GATAAATCGGCAGTCAGAAAAAGAACCGATTGAAACTCTGAGAATAAAGCATTGGAATAGAAGTAATTGGT
 TTAAAGAAGCAGAAAAATCATTTAGACGTGATAAAGAGTTAGGATGCTCAAAAGTGAAC^{Stop}TTTATAG
 GGCTGTGGTTTCCAAAATTTTTTGGCATGATAGACTTAATTTATTTCCCTTAAAGAATAATATTAAATCA
 TTTCAAGTTTGCAGACTAGTGCCATCCAATAGAATTATAATATAAGTCACATATTTTATTTAAATTTTC
 TAGTAACCTACATTAAACAAAGTAAAAGTGAGCAGGGCAAAATAATTTTGATATTACTTTTACCCAGTAG
 TATACCCAAAATAGCGAAATATAGAAATTTATTAATGAGATATTTTACATCCTTTTTTGTACCAAGTCTTC
 TAAATGCAGTACATATTTTATACTTACTGCATTTCTTACTTCCGAGTAGCCATATTTCAAGTGTTCATTG
 CCACATGTGGCCTGTGACTACTGTATTGGACAGTTTCAGTACTAGACAAAACTAGCATAATTAACCTTAGT
 TCTAGCCATGATTTCTATTTGGATTAAAAATTAACCTCTAATCACAGTTAATCCACAGTGCATTCATGCA
 GCTGACAGTTATATTTGTTTTATTGGAGTCATGATATTAATAATCAGCGTTTGTCAACCTCAGGGGATATT
 TAGCAATTGTGCGGAGACATTTTTGATGTCATGACTAGGGCAGTTATTGACATTTAGTGAGTAGAGGCCA
 GGGATCCTGCTAAATAACCTGCATTTGGACAGCGCCCCACAACAAAGAATTATCCTGCCCGAAATGGTAGT
 CGTGCCAAGGCTGAGTAACCTTGTGTTAAAAAGTAACCTGTGGCAGACTAGGTTTCCAGAATTTCTCGGTT
 CTGCTCACGTATCATGTTTGAATAATTTTGGCTATTAAAGATATGTATTAGATGGTCTTATCCTGATTA
 TTACCTGGATACAACCTTGATCTTTCTAATATTTTTCAGAAAGTGATGGGATAACCTTAGAAGAGGACTCA
 GAATGATATTTTATATTTTAAAGTGAGTCTTAAACCTCCTCTTATTTCTACAAGTTATATGGCTAAATTTTC
 AGATTGAACAGGGATTTCAGCATTTCTGCCATCTCCTCATGGAAAGAGAGGCTCCCTCATCTGAAGCGTCTC
 TGAATCTACCTTTGCAAGCTTCAGACAAATCAGTTGATCTCCCTGAGCCACACGGCCTCATCTGTGAG
 GGAGGGAAAGATTAGCCAAAAGAGTTAATTTTCATTCCAAATCACCTTAGCTGTTAGACTGATCTGTTTGTA
 GCAGTTGTTTGTCTCATTTTTGCTCTGTGCATTTTTTGGAGACATTTGTTGAGAATATTTCTATTTGGTGCT
 CTACTGTATTTTTCTTTTTAATATCTACTTGATATCTTGTCTTTTAAATTTTCTTCACATATGGTTTGCC
 TGATAACAATGATTTTTATACTGAAATTTAAGGAATCTAACAGCTAAACCTCAGTAAGTGCATATATTT
 CCTATAACATAGACCGTTGCTACTCTCAGCAACCTCTCCCTCAATTTTTTTTTTCTTGTAGCATGTGATGC
 CTGATTAACCTCATTTTTCATTTGCTTTTTATTTCTAATATGGGAACAATGAGAGTGAACCTCTAAATATAGG
 TTGTAGTAATAAAACATCATTTAGCCTAATTTATAGAAAATGCTAATTAAGTACCAGCACATAGAAACATG
 AAATTGCTTAGTCATTGTACCTTTGTCAGCAATTTTGACAGTCATTAATGTTTGTCTATAATTTTAAATAA
 AGTGCTCGGGTTTCAGAAATACCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAagcg^{NotI}gcgctctaga...

>pEGFP-N1, 4.733 bp, GFP-cDNA

...ccggtcgccacc^{Start}ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC
 TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
 GCTGACCCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTG
 ACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA
 TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGA
 GGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC
 AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGA
 AGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCA
 CTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAG
 TCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCCG
 GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA^{Stop}agcggc...

Proteinsequenzen**>TXNDC16, 825aa**

MFSGFNVFRVGISFVIMCIFYMPTVNSLPQLSPQKYFSTLQPGKASLAYFCQADSPRTSVFLEELNEAVR
 PLQDYGISVAKVNCVKKEISRYCGKEKDLMKAYLFKGNILLREFPTDTLFDVNAIVAHVLFALLFSEVKY
 ITNLEDLQNIENALKGKANIIFSIVRAIGIPEHRAVMEAAFVYGTITYQFVLTTEIALLESIGSEDVEYAH
 LYFFHCKLVLDLTQQCRRTLMEQPLTTLNIHLFIKTMKAPLLTEVAEDPQQVSTVHLQLGLPLVFIVSQQ
 ATYEADRRRTAEWVAWRLLGKAGVLLLLLRDSLEVNIPODANVVFKRAEEGVPVEFLVLHDVDLIISHVENN
 MHIEEIQEDEDNDMEGPDIDVQDDEVAETVFRDRKRKLPLELTVELTEETFNATVMASDSIVLFYAGWQA
 VSMAFLQSYIDVAVKLKGTSTMLLTRINCADWSDVCTKQNVTEFPIIKMYKKGENPVSYAGMLGTEDLLK
 FIQLNRISYPVNITSIQEAEEYLSGELYKDLILYSSVSVLGLFSPTMKTAKEDFSEAGNYLKGYVITGIY
 SEEDVLLLSTKYAASLPALLLARHTEGKIESIPLASTHAQDIVQIITDALLEMFPEITVENLPSYFRLQK
 PLLILFSDGTVNPQYKKAAILTLVKQKYLDSFTPCWLNKNTPVGRGILRAYFDPLPPLPLLVLVNLHSGG
 QVFAFPDQAIIEENLVWLKKEAGLENHITILPAQEWKPPLPAYDFLSMIDAATSQRGTRKVPKCMKE
 TDVQENDKEQHEDKSAVRKEPIETLRIKHWNRSNWFKEAEKSFRDKELGCSKVN-

>GFP, 239aa

MVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTYGVO
 CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH
 KLEYNNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSK
 DPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK-

8 Publikationen

Im Laufe meiner Promotion am Institut für Humangenetik bei Prof. Dr. Eckart Meese sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

1. Keller A*, Harz C*, Matzas M, Meder B, Katus HA, Ludwig N, Fischer U, Meese E (2011) **Identification of novel SNPs in glioblastoma using targeted resequencing**. PLoS One 6: e1815
2. Backes C, Ludwig N, Leidinger P, Harz C, Hoffmann J, Keller A, Meese E, Lenhof HP (2011) **Immunogenicity of autoantigens**. BMC Genomics 12: 340
3. Ludwig N, Keller A, Leidinger P, Harz C, Backes C, Lenhof HP, Meese E (2012) **Is there a general autoantibody signature for cancer?** Eur J Cancer 48:2451-61
4. Leidinger P, Keller A, Ludwig N, Harz C, Lenhof HP, Wullich B, Meese E (2013) **Combination of autoantibody signature with PSA level enables a highly accurate blood-based differentiation of prostate cancer patients from patients with benign prostatic hyperplasia**. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht
5. Ludwig N, Leidinger P, Harz C, Schmitt J, Backes C, Keller A, Lenhof HP, Meese E (2013) **Lost in autoantibody signatures?** Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht
6. Backes C, Harz C, Fischer U, Schmitt J, Ludwig N, Petersen BS, Kim YJ, Wolf N, Katus HA, Meder B, Furtwängler R, Franke A, Bohle R, Henn W, Graf N, Keller A, Meese E (2013) **Exome sequencing identifies novel genetic variations in a glioblastoma multiforme family**. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht
7. Harz C, Ludwig N, Lang S, Werner T, Galata V, Backes C, Schmitt K, Nickels R, Krause E, Jung M, Menger MD, Rettig J, Zimmermann R, Meese E (2013) **Subcellular localization of the meningioma-associated antigen TXNDC16 and characterization of immunogenic protein regions**. Manuskript in Vorbereitung

* gleichberechtigte Erstautoren

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Bereitstellung dieses interessanten Promotionsthemas und für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Weiterhin möchte ich mich für seine stete Diskussionsbereitschaft sowie sein offenes Ohr, für alle Anliegen jedweder Art, bedanken. Seit nun fast fünf Jahren darf ich in seiner Arbeitsgruppe arbeiten und weiß sein Vertrauen und den mir damit gewährten großzügigen Spielraum in der Durchführung meine experimentellen Ideen sehr zu schätzen.

Bei Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie darf ich mich ebenfalls ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation bedanken. Des Weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich an seinem Institut die Experimente der *in vitro* Transkription und Translation durchführen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim Oertel aus dem Institut für Neurochirurgie sowie bei Herrn Prof. Dr. Hermann Eichler aus dem Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung der Meningeom- bzw. Kontrollseren bedanken.

Herrn Prof. Dr. Christian Mawrin aus dem Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, möchte ich für die Bereitstellung der Meningeomzelllinien Ben-Men-1, HBL-52 und IOMM-Lee danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Nicole Ludwig, die mich seit meiner Fortgeschrittenenarbeit und meiner Diplomarbeit am Institut für Humangenetik stets unterstützt und für mich eine große Stütze war während all den Jahren. Ich danke ihr nicht nur für die gute Zusammenarbeit auf beruflicher Ebene, sondern auch für ihre Herzlichkeit auf privater Ebene. Außerdem möchte ich mich bei ihr für die Durchsicht meiner Dissertation bedanken.

Ein großer Dank gilt Frau Katja Schmitt, die seit fast drei Jahren eine tolle Büro- und Schreibtischnachbarin für mich ist, mit der ich schon den einen oder anderen Lachkrampf erleben durfte. Vielen Dank für die wunderschöne Atmosphäre und den Spaß auch außerhalb des Büros und danke für die Durchsicht meiner Dissertation.

Bei Frau Valentina Galata darf ich mich für die Auswertung der Peptidarraydaten ganzherzlich bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Christina Backes und Frau Sabine Müller, die ihr bei allen Fragen eine Unterstützung waren.

Vielen Dank geht an Frau Tamara Werner für die Klonierung vieler in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Humangenetik möchte ich einen großen Dank aussprechen. Keine Frage, die ich ihnen stellen durfte, war zu dumm und keine Hilfe, um die ich sie bat, zu schwer. Nicht zuletzt durch ihre Wärme und Offenherzigkeit trugen sie jeden Tag zu einer tollen Arbeitsatmosphäre bei, die ich nicht nur morgens bei einer gemeinsamen Tasse Kaffee erleben durfte.

Ohne das Wissen und die experimentelle Erfahrung von Herrn Dr. Sven Lang, aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Zimmermann, wären viele Versuche gar nicht erst entstanden. Für seine Inspiration und seine Hilfsbereitschaft möchte ich mich recht herzlich bedanken. Aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Zimmermann darf ich Herrn PD Dr. Martin Jung sehr für seine stete Diskussionsbereitschaft danken. Ein großer Dank gilt auch Frau Melanie Theis, Herrn Nico Schäuble und Herrn Stefan Schorr, mit denen nicht nur die tägliche Fahrt mit dem ÖPNV Freude gemacht hat, sondern von denen ich auch bei jeder Fahrt neue Inspirationen und Ideen für meine Arbeit sammeln konnte.

Bei Frau Ruth Nickels aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen recht herzlich bedanken.

Herrn PD Elmar Krause aus dem Institut für zelluläre Neurophysiologie gilt mein Dank für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Konfokalaufnahmen.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, meinen Schwiegereltern und meiner gesamten Familie, sowohl für ihre finanzielle aber vor allem für die emotionale Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

Der größte Dank gilt allerdings meinem Ehemann Dominik, der für mich seit mehr als drei Jahren eine riesige emotionale Stütze war und ist. Er hat immer an mich geglaubt, mich motiviert und mir ständig Mut gemacht. Vor allem in den letzten Monaten musste er mich oft entbehren. Für sein Verständnis und seine Unterstützung bin ich ihm zu tiefst dankbar.